

Grünleguminosen als Eiweiß- und Raufuttermittel in der ökologischen Masthühnerfütterung

von Lydia Pleger

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Grünleguminosen als Eiweiß- und Raufuttermittel in
der ökologischen Masthühnerfütterung**

von Lydia Pleger
aus Stuttgart

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Angefertigt an der Fakultät Nachhaltige Agrar- und Energiesysteme
der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf

Mentor: Prof. Dr. Gerhard Bellof

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korb

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
TABELLENVERZEICHNIS	XVI
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	5
2.1 Hühnermast unter den Bedingungen der ökologischen Landwirtschaft	5
2.1.1 Vorgaben für die ökologische Hühnermast	5
2.1.2 Empfehlungen zum Nährstoff- und Energiebedarf für ökologische Masthühner	8
2.1.3 Grünleguminosen als Protein- und Aminosäurequellen in der ökologischen Masthühnerfütterung	11
2.1.3.1 Anbau, Werbung, Konservierung und Eigenschaften von Grünleguminosen	11
2.1.3.2 Inhaltsstoffe und Futterwert von Luzerneprodukten	16
2.1.3.3 Inhaltsstoffe und Futterwert von Rotkleeprodukten	20
2.1.3.4 Antinutritive Inhaltsstoffe in Luzerne- und Rotkleeprodukten	22
2.2 Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit beim wachsenden Geflügel	27
2.2.1 Methodik zur Bestimmung der praecaecalen Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit	27
2.2.2 Einflüsse auf die Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit beim wachsenden Geflügel	29
2.3 Einsatz von Luzerneprodukten in der Masthühnerfütterung	32
3. PUBLIKATIONEN	35
3.1 Verdauungsversuch: Die praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren in Blättern und Silagen von Luzerne (<i>Medicago sativa</i>) und Rotklee (<i>Trifolium pratense</i>) bei Masthühnern	35
3.2 Leistungsversuch: Effekte steigender Anteile an Luzerneblättern (<i>Medicago sativa</i>) auf die Mast- und Schlachtleistung ökologischer Masthühner	67
4. DISKUSSION	107
4.1 Verdauungsversuch: Die praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren in Blättern und Silagen von Luzerne (<i>Medicago sativa</i>) und Rotklee (<i>Trifolium pratense</i>) bei Masthühnern	107
4.1.1 Methodik des durchgeführten Verdauungsversuchs	107

4.1.2 Diskussion der ermittelten Verdaulichkeitswerte sowie der Vergleich mit Werten aus der Literatur für Geflügel und andere Monogastrier	110
4.2 Leistungsversuch: Effekte steigender Anteile an Luzerneblättern (<i>Medicago sativa</i>) auf die Mast- und Schlachtleistung ökologischer Masthühner	115
4.3 Zusammenfassende Diskussion beider Versuche	119
4.4 Schlussfolgerungen	122
5. ZUSAMMENFASSUNG	125
6. SUMMARY	129
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	131
8. DANKSAGUNG	151

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AL	Alfalfa leaves dried by high temperatures
ALLT	Alfalfa leaves dried by low temperatures
AME _N	Scheinbar umsetzbare Energie, Stickstoff (N)-korrigiert
ANF	Antinutritive Faktoren
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Cys	Cystin
EU	Europäische Union
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GP	Ganzpflanze(n)
His	Histidin
LB	Luzerneblätter
LBS	Luzerneblattsilage
LG	Lebendgewicht
LM	Luzernemehl (Luzerne-Ganzpflanze)
LS	Luzernesilage
LW	Lebenswoche
Lys	Lysin
Met	Methionin
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
pc	praecaecal
pcV	praecaecale Verdaulichkeit
PPO	Polyphenoloxidase
RKB	Rotkleeblätter
RKS	Rotkleesilage
Thr	Threonin
TM	Trockenmasse
XA	Rohasche
XF	Rohfaser
XL	Rohfett
XP	Rohprotein

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Strukturen verschiedener Aglykone der Luzernesaponine (eigene Darstellung)	22
---	----

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Inhaltsstoff- und AME _N -Gehalte von Luzerne-GP, LS und LB (g/kg TM bzw. MJ AME _N /kg TM)	16
Tabelle 2: Verdaulichkeit von XP, Lys und Met (praecaecale Verdaulichkeit) aus <i>in vitro</i> (Schwein) und <i>in vivo</i> (Masthuhn) Untersuchungen mit LM, LS und LB (Angaben in %)	18
Tabelle 3: Inhaltsstoff- und AME _N -Gehalte von Rotklee-GP, RKS und RKB (g/kg TM bzw. MJ AME _N /kg TM)	20
Tabelle 4: Verdaulichkeit von XP, Lys und Met (praecaecale Verdaulichkeit) aus <i>in vitro</i> (Schwein) Untersuchungen mit Rotklee-GP und RKB (Angaben in %).....	21
Tabelle 5: Vergleich der praecaecalen Verdaulichkeit von XP und AS in Luzerneblättern (LB) der vorliegenden Studie mit Literaturergebnissen (Angaben in %)	110
Tabelle 6: Vergleich der praecaecalen Verdaulichkeit von XP und AS in Rotkleeblättern (RKB) der vorliegenden Studie mit Literaturergebnissen (Angaben in %)	111
Tabelle 7: Vergleich der praecaecalen Verdaulichkeit von XP und AS (Masthühner) in Luzernesilage (LS) und Rotkleesilage (RKS) der vorliegenden Studie mit Literaturergebnissen (Angaben in %).....	112

1. EINLEITUNG

Der Verzehr von Geflügelfleisch in Deutschland nimmt seit Jahren zu. So ist der Geflügelfleischverzehr pro Kopf im Jahr 1991 von 7,3 kg auf 13,2 kg im Jahr 2018 gestiegen (BLE, 2018, 2019). Auch wenn die Nachfrage nach Geflügel hauptsächlich durch konventionell gemästete Tiere gedeckt wird, nimmt der Absatz von Bio-Geflügel zu, allerdings mit einem Marktanteil von ungefähr 2 % im Jahr 2017 noch auf niedrigem Niveau (SCHAACK und RAMPOLD, 2018). Innerhalb des Bio-Geflügels stellen Masthühner die absatzstärkste Geflügelart dar (SCHAACK et al., 2018). Die steigende Nachfrage nach ökologisch erzeugtem Geflügelfleisch bedingt folglich auch einen erhöhten Bedarf an Futtermitteln (FRÜH et al., 2015). Die bedarfsgerechte Eiweißversorgung von Geflügel, insbesondere die Versorgung mit essenziellen Aminosäuren (AS), bedeutet für die ökologische Landwirtschaft eine große Herausforderung (SCHUMACHER et al., 2011). Für das Geflügel stellt Methionin (Met) die erstlimitierende AS dar (SAUER et al., 2008; BUNCHASAK, 2009), weshalb insbesondere methioninreiche Futtermittel für die Hühnermast benötigt werden. In Europa übersteigt der Bedarf an hochwertigen Eiweißfuttermitteln allerdings deren Produktion, wodurch die sogenannte Eiweißlücke entsteht. Auch in Deutschland werden in der ökologischen Landwirtschaft zur Schließung der Eiweißlücke Eiweißfuttermittel, wie Sojabohnen bzw. -kuchen und Sonnenblumen bzw. -kuchen, importiert (DETZEL et al., 2018). In der ökologischen Masthühnerfütterung sollen die Tiere jedoch mit ökologisch sowie überwiegend im eigenen Betrieb oder regional erzeugten Futtermitteln versorgt werden (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007). Auch wenn der Import ökologischer Sojabohnen zulässig ist, steht dies im Widerspruch zum Konzept der betriebseigenen Futtermittelproduktion und der Schaffung von geschlossenen Nährstoffkreisläufen (FRÜH et al., 2015), wie sie in der ökologischen Landwirtschaft angestrebt werden (BMEL, 2020). Allerdings stehen in der Europäischen Union (EU) sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht ausreichend Eiweißfuttermittel für die bedarfsgerechte Versorgung von Geflügel im ökologischen Landbau zur Verfügung, weshalb die bestehende Ausnahmeregelung, 5 % konventionell erzeugte Eiweißfuttermittel für Geflügel einzusetzen, bis 31. Dezember 2020 verlängert wurde (DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2018/1584). Um die Eiweißlücke zu schließen und eine 100 %-Biofütterung zu realisieren, werden verschiedene, betriebs- und regionenindividuelle Lösungsansätze benötigt (FRÜH, 2014).

Eine Lösung könnte der Einsatz von Grünleguminosen wie Luzerne oder

verschiedene Kleearten als Eiweißfuttermittel in der ökologischen Masthühnerfütterung sein. Zur Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit sind Leguminosen aufgrund ihrer Stickstoff bindenden Eigenschaften wesentlicher Bestandteil der ökologischen Fruchtfolge (KOLBE, 2008). Vor der Blüte geerntet, werden in der Luzerne bzw. im Rotklee Rohproteingehalte (XP) von durchschnittlich 244 g/kg Trockenmasse (TM) bzw. 225 g/kg TM sowie Met-Gehalte von 2,2 bzw. 1,9 g/kg TM mit Rohfasergehalten (XF) von jeweils 172 g/kg TM erreicht (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). Bei einem sehr frühen Schnitzeitpunkt vor der Knospe kann die Luzerne-Ganzpflanze Gehalte von bis zu 299 g XP/kg TM und 5,3 g Met/kg TM sowie 217 g XF/kg TM aufweisen (WELTIN et al., 2014). Untersuchungen zum Einsatz von Luzernesilage aus ‚früher Nutzung‘ als Eiweißfuttermittel lieferten vielversprechende Ergebnisse beim Masthuhn (WÜSTHOLZ et al., 2016). Der Einsatz von Grünleguminosen als Ganzpflanzensilagen würde neben dem nutritiven Beitrag zur AS-Versorgung auch die Vorgabe der Raufutternorm, wie sie für ökologisches Geflügel vorgeschrieben ist (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007; VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008), erfüllen. Hohe Fasergehalte können jedoch die Verdaulichkeit von Nährstoffen reduzieren (BUXTON, 1996). Die Trennung der Blatt- von der Stängelmasse stellt eine Möglichkeit dar, den XF-Gehalt der Blattmasse im Vergleich zur Ganzpflanze (GP) von Luzerne bzw. Rotklee zu reduzieren (125 bzw. 130 g/kg TM). Zusätzlich werden dadurch die XP-Gehalte (283 bzw. 268 g XP/kg TM) erhöht und eine Aufkonzentrierung der AS (beispielsweise Met: 2,8 bzw. 2,5 g/kg TM) erreicht (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). Der bislang in der ökologischen Geflügelfütterung bevorzugt als Eiweißfuttermittel eingesetzte Sojakuchen enthält 452 g XP/kg TM und 6,5 g Met/kg TM (GANZER et al., 2017). Die Blattmasse von Grünleguminosen stellt damit ein vielversprechendes Futtermittel zur Eiweiß- und AS-Versorgung von Masthühnern dar.

Jedoch enthalten Luzerne und Kleearten auch Saponine als sekundäre Inhaltsstoffe, die insbesondere für monogastrische Tiere antinutritiv wirksam sind. Negative Effekte sind hierbei ihr bitterer Geschmack, die Reduzierung der Futteraufnahme, die Beeinflussung von Verdauungs- und Absorptionsprozessen sowie Wachstumsdepressionen (CHEEKE, 1983, 1996). Allerdings konnten SZUMACHER-STRABEL et al. (2019) zeigen, dass es während der Silierung von Luzerne zu quantitativen und strukturellen Veränderungen von Saponinen kommen kann.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurden die beiden Grünleguminosen Luzerne und Rotklee ausgewählt. Die folgende Arbeit umfasst

zwei Fütterungsversuche mit ökologischen Masthühnern. Da der Futterwert eines Futtermittels nicht nur von den Nährstoffgehalten, sondern auch von deren Verdaulichkeit im Tier abhängt, wurde in einem Verdauungsversuch die praecaecale Verdaulichkeit (pcV) von XP und AS verschiedener Luzerne- und Rotkleeprodukte mittels linearer Regression (RODEHUTSCORD et al., 2004) bestimmt. Untersucht wurden hierbei die Futtermittel Luzernesilage (LS), Rotkleesilage (RKS), Luzerneblätter (LB) und Rotkleeblätter (RKB). Durch die Saponinanalyse von LS und LB sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Saponingehalt und pcV von XP und AS ermittelt werden. Weiterhin wurde in einem Leistungsversuch der Effekt steigender LB-Anteile in Alleinfuttermischungen auf die Mast- und Schlachtleistung von ökologischen Masthühnern untersucht. Dabei wurde unter anderem geprüft, ob und zu welchen Anteilen LB erfolgreich in der ökologischen Masthühnerfütterung eingesetzt werden können. Außerdem sollte auch hier ein Zusammenhang zwischen dem Saponingehalt der LB und der Leistung der Masthühner herausgearbeitet werden. Da Luzerne außerdem auch Carotinoide enthält (CASTAÑEDA et al., 2005), wurde weiterhin der Einfluss der LB auf die Färbung von Haut, Fleisch und Fett der Masthühner untersucht.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Hühnermast unter den Bedingungen der ökologischen Landwirtschaft

2.1.1 Vorgaben für die ökologische Hühnermast

In den EU-Rechtsvorschriften wird die Erzeugung von landwirtschaftlichen Lebensmitteln und Erzeugnissen für den ökologischen Landbau genau definiert. Auch die ökologische Tierhaltung, einschließlich der Hühnermast, wird durch diese geregelt. So gelten bestimmte Vorgaben für die Haltung, wie beispielsweise Besatzdichte und Unterbringung, die Wahl bestimmter genetischer Linien, die Mastdauer und die Fütterung von ökologischen Masthühnern.

Haltung

In der ökologischen Tierhaltung sollen die für die jeweilige Tierart spezifischen verhaltensbedingten Bedürfnisse erfüllt, hohe Tierschutzstandards beachtet und der Tierbestand auf Basis der Krankheitsprophylaxe gesund erhalten werden (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007). So dürfen höchstens 4800 Hühner in einem Geflügelstall untergebracht werden. Dabei können mehrere Stalleinheiten in einem Stallgebäude untergebracht sein, wenn sie klar voneinander getrennt sind. Bei der Erzeugung von Fleisch darf die Gesamtnutzfläche der Geflügelställe je Produktionseinheit maximal 1600 m² betragen (VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008). In der EU ist in der konventionellen Hühnermast bei Erfüllung bestimmter Kriterien eine Besatzdichte von maximal 42 kg Lebendgewicht (LG) je m² erlaubt (RICHTLINIE 2007/43/EG), in Deutschland ist jedoch nur eine Besatzdichte von maximal 39 kg LG/m² zulässig (TIERSCHUTZ-NUTZTIERHALTUNGSVERORDNUNG). Ökologisch gehaltenen Masthühnern steht im Vergleich dazu ein deutlich größeres Platzangebot zur Verfügung. Ein ausreichendes Platzangebot soll das Wohlbefinden von ökologisch gehaltenen Tieren sicherstellen und ausreichend Möglichkeiten zu Bewegungen wie Strecken und Flügelschlagen bieten. Verglichen mit der konventionellen Mast ist daher die Besatzdichte in der ökologischen Hühnermast mit maximal 10 Tieren bzw. 21 kg LG je m² Stallfläche deutlich geringer. In beweglichen Geflügelställen von maximal 150 m² Bodenfläche ist eine Besatzdichte von 16 Tieren bzw. ein maximal zulässiges LG von 30 kg je m² erlaubt (VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008).

Zusätzlich muss Geflügel mindestens ein Drittel seiner Lebensdauer Zugang zu einem Auslauf haben. Dieses Freigelände muss den Tieren Unterschlupf bieten und größtenteils von Vegetation bedeckt sein. Der Zugang zu einer angemessenen Anzahl an Futtertrögen und Wassertränken muss ungehindert

möglich sein. Die Größe des Auslaufs hat dabei 4 m² je Tier bzw. bei der Haltung in beweglichen Geflügelställen 2,5 m² je Tier zu betragen (VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008).

Herkunft

Die EU-Rechtsvorschriften schreiben weiterhin die Herkunft der Tiere aus dem ökologischen Landbau vor (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007). Nur wenn beim Aufbau oder der Erneuerung eines Bestands nachweislich keine ausreichenden Mengen an ökologisch aufgezogenen Tieren verfügbar sind, dürfen nichtökologische Masthühner nach vorheriger Genehmigung für die ökologische Fleischerzeugung zugekauft werden, sofern die Tiere weniger als drei Tage alt sind (VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008). Außerdem sollen in der ökologischen Hühnermast intensive Aufzuchtmethoden vermieden werden. Aus diesem Grund muss entweder ein Mindestschlachtalter von 81 Tagen eingehalten werden oder die Hühnermast muss mit Tieren langsam wachsender Rassen bzw. Linien erfolgen (VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008). Die Festlegung der Kriterien für diese obliegt der zuständigen Behörde. Aktuell werden als langsam wachsende Herkünfte alle Herkünfte bezeichnet, für die der Anbieter unter konventionellen Haltungsbedingungen Tageszunahmen von 44 g im Mastabschnitt bis 2 kg angibt (LÖK, 2009). Als langsam wachsend gelten beispielsweise die Herkünfte Hubbard (ISA) JA 757 oder Cobb-Sasso-150 (SCHMIDT und BELLOF, 2008). Die Mastdauer von langsam wachsenden Herkünften beträgt meist acht bis zwölf Wochen, wobei ein Mastendgewicht von 2 bis 2,5 kg erreicht wird (BELLOF und TIMMLER, 2004).

Fütterung

Spezielle Vorgaben gelten insbesondere für die Fütterung ökologisch gehaltener Tiere. Die Fütterung der Tiere soll mit ökologischen Futtermitteln erfolgen, die überwiegend im eigenen Betrieb oder zumindest aus einem anderen ökologisch wirtschaftenden Betrieb des gleichen Gebiets erzeugt wurden (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007; VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008). Für Geflügel gilt hierbei ein Mindestanteil von 20 % an betriebseigenen oder regional erzeugten Futtermitteln. Die EU-Rechtsvorschriften schränken dadurch den Einsatz von konventionellen und importierten Futtermitteln stark ein. Da die Versorgung mit 100 % ökologischen Proteinfuttermitteln in der EU aber derzeit noch nicht vollständig gewährleistet werden kann, wurde eine Übergangsregelung festgesetzt, durch die höchstens 5 % nichtökologische Eiweißfuttermittel für Schweine und Geflügel eingesetzt werden dürfen, wenn eine Versorgung mit ausschließlich ökologischen Futtermitteln nicht umgesetzt werden kann (DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU)

2018/1584; VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008). Die schon mehrmals verlängerte Übergangsregelung wurde aufgrund der weiterhin bestehenden Problematik zuletzt im Jahr 2018 verlängert und gilt nun bis 31. Dezember 2020 (DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2018/1584). Der Einsatz von Futtermitteln konventionellen Ursprungs wird von den Verbänden für ökologischen Landbau wie Bioland und Naturland sogar noch strenger auf nur wenige zugelassene Futtermittel beschränkt (BIOLAND, 2019; NATURLAND, 2019). In der Hähnchenmast von Bioland-Betrieben sind einzig Kartoffeleiweiß und Maiskleber als Futtermittel konventionellen Ursprungs erlaubt (BIOLAND, 2019).

Darüber hinaus ist auch die Ergänzung von Futtermischungen mit synthetischen AS in der ökologischen Masthühnerfütterung nicht zulässig (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007). Damit können methioninarmer Rationen nicht durch die Einmischung von DL-Methionin ergänzt werden, wie es in der konventionellen Fütterung möglich ist (DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) NR. 469/2013). Auch die Verwendung von chemisch-synthetischen Lösungsmitteln in der Futtermittelherstellung ist verboten (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007), wodurch der Einsatz von Extraktionsschroten in der ökologischen Fütterung ausgeschlossen ist. Soja- oder Rapsextraktionsschrote dürfen somit nicht in ökologische Futterrationen eingemischt werden. Stattdessen stellen beispielsweise Soja- und Sonnenblumenkuchen wertvolle Aminosäurequellen für die ökologische Masthühnerfütterung dar (BELLOF, 2013). Um seinen ethologischen Bedürfnissen nachkommen zu können, muss Geflügel außerdem täglich Zugang zu frischem, getrocknetem oder siliertem Raufutter gewährleistet werden. Dies ist besonders zu beachten, sofern Geflügel gemäß auf gemeinschaftsrechtlicher Grundlage erlassener Verpflichtungen oder Beschränkungen im Stall gehalten wird und somit keinen Zugang zu Auslauf hat (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007; VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008).

2.1.2 Empfehlungen zum Nährstoff- und Energiebedarf für ökologische Masthühner

Das Wachstumspotenzial von Masthühnern, unabhängig ihrer Herkunft, kann nur durch eine bedarfsgerechte Versorgung mit Nährstoffen und Energie ausgeschöpft werden. Dabei stellt weniger die Energieversorgung der wachsenden Masthühner die ökologische Landwirtschaft vor Herausforderungen, sondern vielmehr die bedarfsgerechte Versorgung mit limitierenden AS (SCHUMACHER et al., 2011). Gegenüber schnell wachsenden Herkünften ist der Nährstoff- und Energiebedarf langsam wachsender Herkünfte bei gleichem Alter allerdings etwas geringer (BELLOF und TIMMLER, 2004).

Bedarf an Protein und AS

Neben der Versorgung mit den Nährstoffen Fette und Kohlenhydrate kommt der Proteinversorgung in der Geflügelmast eine zentrale Bedeutung zu. Um das Produktionsziel - Erzeugung von vollfleischigen Schlachtkörpern - zu erreichen, muss ein hoher Proteinansatz angestrebt werden. Aus Sicht der Fütterung müssen hierfür die notwendigen AS in ausreichender Menge bereitgestellt werden. Geflügel hat genau betrachtet weniger einen Bedarf an Protein, sondern einen Bedarf an AS. Die für das Geflügel essenziellen AS sind Methionin, Lysin, Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin (SIMON und ZENTEK, 2019a). Da diese AS nicht vom Körper synthetisiert werden können, müssen sie in ausreichender Menge und in einem bestimmten Verhältnis zueinander über das Futter aufgenommen werden. Cystin und Tyrosin stellen halbessenzielle AS dar. Sie können zwar vom Geflügel synthetisiert werden, werden jedoch aus ihren Vorstufen gebildet. Diese stellt bei Cystin das essenzielle Methionin dar, bei Tyrosin die essenzielle AS Phenylalanin. Bei ungenügender Zufuhr von Cystin und Tyrosin ergibt sich dadurch ein höherer Bedarf an Methionin und Phenylalanin (GFE, 1999; SIMON und ZENTEK, 2019a). Methionin stellt beim Geflügel die erstlimitierende AS dar (SAUER et al., 2008; BUNCHASAK, 2009). Es wird von wachsendem Geflügel für Federwachstum und Proteinansatz benötigt, pflanzliche Proteinquellen weisen jedoch meist nur niedrige Methioningehalte auf (BUNCHASAK, 2009). Die bedarfsgerechte Versorgung mit Methionin stellt damit sowohl die konventionelle als auch die ökologische Masthühnerfütterung vor Herausforderungen. In der konventionellen Fütterung wird dieses Problem üblicherweise durch den Import von Sojaprodukten (FRÜH et al., 2015) und die Supplementierung von Masthühnerrationen mit DL-Methionin gelöst (SAUER et al., 2008). Da im ökologischen Landbau jedoch hauptsächlich betriebseigene oder regional erzeugte Futtermittel eingesetzt werden sollen und der Einsatz von

synthetischen AS nicht erlaubt ist, bedarf es hierfür anderer Lösungsansätze.

Energiebedarf

Der Energiebedarf setzt sich aus dem Erhaltungsbedarf sowie dem Leistungsbedarf, bestehend aus dem Bedarf für Proteinenergieansatz und dem Bedarf für Fettenergieansatz, zusammen. Der Erhaltungsbedarf ist vor allem von der Lebendmasse der Tiere abhängig, wird aber unter anderem auch von der Umgebungstemperatur und der Haltung beeinflusst. So können niedrige oder hohe Temperaturen im Auslauf und die höhere Bewegungsaktivität ökologisch gehaltener Masthühner zu Veränderungen im Erhaltungsbedarf führen (JEROCH, 2019b). Der Energiebedarf pro Tag steigt mit fortschreitendem Alter der Tiere an und unterscheidet sich dabei für weibliche und männliche Tiere aufgrund der zunehmenden Wachstumsdifferenz immer stärker. Die von der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) herausgegebenen Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Masthühnern (GfE, 1999) benennen für die Anfangsmast Energiegehalte (AME_N , scheinbar umsetzbare Energie, Stickstoff (N)-korrigiert) von ungefähr 12,5 MJ AME_N bis ca. 13,4 MJ AME_N je kg Alleinfutter in der Endmast. Im Vergleich zu schnell wachsenden Masthühnerherkünften haben langsam wachsende Masthühner allerdings einen etwas geringeren Energiebedarf (JEROCH, 2019b).

Energiegehalt und AS-Konzentration in Futtermischungen

In der ökologischen Hühnermast kann der Zusammenhang zwischen der Energiedichte des Futters und der Futteraufnahme der Masthühner für eine bedarfsgerechte Versorgung mit essenziellen AS, vor allem mit dem erstlimitierenden Methionin, genutzt werden. Die Futteraufnahme beim Masthuhn sinkt mit steigenden Energiegehalten und nimmt bei niedrigerer Energiedichte im Futter zu (FLACHOWSKY, 1973; WÜRZNER und LETTNER, 1984; ROTH et al., 1993; PETER et al., 1997). Aus diesem Grund muss der AS-Gehalt immer in Relation zum Energiegehalt des Futters gesetzt werden (JEROCH, 2019b). Für eine bedarfsgerechte Met-Versorgung empfiehlt die GfE (1999) beispielsweise ein Verhältnis von 0,31 (0.-3. Woche), 0,27 (3.-6. Woche) und 0,24 g Met/MJ AME_N (6.-8. Woche). Daraus wird deutlich, dass die AS-Konzentration im Futter mit steigendem Alter reduziert werden kann und daher eine altersabhängige Phasenfütterung erforderlich ist (BELLOF und TIMMLER, 2004). Wenn das empfohlene Verhältnis von AS zu Energie konstant bleibt, können Futtermischungen mit abgesenkten Energiegehalten (< 12 MJ ME/kg) und geringeren Gehalten an essenziellen AS erfolgreich zum Einsatz kommen (BELLOF

et al., 2005; CARRASCO und BELLOF, 2013). Durch die gesteigerte Futteraufnahme nehmen langsam wachsende Masthühner trotz geringerer AS-Ausstattung eine adäquate Menge an essenziellen AS auf und zeigen eine gute Mast- und Schlachtleistung.

Der Bedarf an essenziellen AS (g AS/ MJ AME_N) sinkt mit zunehmendem Alter der Masthühner und ist für weibliche Tiere mit fortschreitendem Alter niedriger als für männliche Tiere. Dies erlangt vor allem bei der langen Mastdauer in der ökologischen Masthühnerfütterung Bedeutung. In einer Studie von CARRASCO et al. (2014) erreichten langsam wachsende weibliche Masthühner die maximale Wachstumsrate und den maximalen Proteinansatz deutlich früher als männliche Tiere. Die Ergebnisse zeigten, dass in der ökologischen Fütterung von weiblichen Tieren durch spezifische Fütterungsstrategien ab dem 28. Tag Energie und Protein eingespart werden könnten. Weitere Untersuchungen zur bedarfsgerechten Energie- und Nährstoffversorgung, dem Startzeitpunkt eines angepassten Fütterungsprogramms und dem Schlachalter langsam wachsender weiblicher Masthühner scheinen in diesem Zusammenhang sinnvoll.

Empfehlungen zum Mineral- und Wirkstoffbedarf

Um Mangelsymptome zu vermeiden, müssen Masthühner ausreichend mit Mengen- und Spurenelementen sowie Vitaminen versorgt sein. Die Versorgung erfolgt dabei weniger durch die entsprechenden Konzentrationen in den einzelnen Futterkomponenten, sondern vor allem durch Vormischungen, die entsprechende Gehalte zur Futterergänzung enthalten. Unter den Mengenelementen ist eine Ergänzung von Calcium, Phosphor, Natrium und Chlorid notwendig, während Magnesium und Kalium nicht ergänzt werden müssen (BELLOF und TIMMLER, 2004). Bei ausreichender Versorgung mit schwefelhaltigen AS ist eine Ergänzung von Schwefel nicht erforderlich. Neben den genannten Mengenelementen ist auch die Versorgung mit den Spurenelementen Eisen, Kupfer, Zink, Mangan, Iod und Selen essenziell (GFE, 1999). Weiterhin ist eine Ergänzung aller fettlöslichen Vitamine A, D₃, E und K₃ sowie einiger wasserlöslicher Vitamine, wie beispielsweise der Vitamine des B-Komplexes, erforderlich (BELLOF und TIMMLER, 2004; JEROCH, 2019b). Außerdem muss eine ausreichende Versorgung mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren α -Linolensäure und Linolsäure gesichert sein, da diese nicht im Körper synthetisiert werden können (GFE, 1999).

2.1.3 Grünleguminosen als Protein- und Aminosäurequellen in der ökologischen Masthühnerfütterung

2.1.3.1 Anbau, Werbung, Konservierung und Eigenschaften von Grünleguminosen

Anbau

Leguminosen sind im ökologischen Landbau ein wichtiger Bestandteil der Fruchtfolge, welche der Erhaltung bzw. Steigerung der Fruchtbarkeit und biologischen Aktivität des Bodens dient. In den EU-Rechtsvorschriften ist eine geeignete mehrjährige Fruchtfolge, die den Anbau von Leguminosen einschließt, daher vorgeschrieben (VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007). Da im ökologischen Landbau auf synthetische Dünge- und Pflanzenschutzmittel verzichtet wird, stellt die Fruchtfolge hier ein zentrales Element im Pflanzenbau dar (HOFMANN et al., 2015). Grünleguminosen wie auch Körnerleguminosen besitzen die Fähigkeit, mit Hilfe von Knöllchenbakterien (Rhizobien) Luftstickstoff zu fixieren. In dieser Symbiose werden die Rhizobien, die sich in Wurzelknöllchen ansiedeln, von der Leguminose mit Kohlenhydraten versorgt. Die Rhizobien wiederum stellen der Leguminose den fixierten Luftstickstoff zur Verfügung, den diese zum Aufbau von Proteinen verwendet und außerdem für nachfolgende Kulturen zur Verfügung stellt. In ihrer bodenfruchtbarkeitsfördernden Wirkung unterliegen Körnerleguminosen, die nur einjährig angebaut werden, dem mehrjährigen Futterbau (KOLBE et al., 2002). Zu den mehrjährig genutzten Futterpflanzen gehören Grünleguminosen wie Luzerne, Rotklee und andere Kleearten (KOLBE, 2008). Der Aufwuchs der Grünleguminosen wird bislang entweder gemulcht (PIETSCH et al., 2004; WIENS et al., 2006), als Substrat in der Biogaserzeugung verwendet (HOFMANN et al., 2015; BLUMENSTEIN et al., 2018) oder als Eiweißfuttermittel in der Wiederkäuerfütterung genutzt (MERRY et al., 2006; BAYAT et al., 2010; HAKL et al., 2016). Verschiedene Studien belegen aber auch ein hohes Potenzial von Grünleguminosen zur Versorgung von monogastrischen Tieren, wie beispielsweise Masthühnern, mit essenziellen AS (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016; WÜSTHOLZ et al., 2016).

Werbung

Nach der Saat können Grünleguminosen in mehreren aufeinander folgenden Jahren genutzt werden, wobei üblicherweise vier bis fünf Schnitte im Jahr geerntet werden (MIN, 2016; BÖHM und AULRICH, 2019). Für die Nutzung in der Nutztierfütterung wird für gewöhnlich der gesamte Aufwuchs gewonnen. Das

gewonnene GP-Material umfasst Blätter und Stängel und kann dadurch mit bis zu 331 g/kg TM recht hohe XF-Gehalte aufweisen (LFL, 2019). Obere Pflanzenteile und Blätter enthalten im Vergleich zu den unteren stängelhaltigen Pflanzenteilen deutlich höhere Proteingehalte (EDWARDS et al., 1979). Diese können durch die Werbung nur bestimmter Teile des Aufwuchses genutzt werden. Eine Möglichkeit stellt hier die Ernte der oberen Pflanzenteile durch die Einstellung einer hohen Schnitthöhe konventioneller Erntetechnik dar (EDWARDS et al., 1979). Eine weitere Möglichkeit zur Werbung bestimmter Teile des Aufwuchses bietet die Blatt-Stängeltrennung. Dabei kommen meist sogenannte Blattabstreif-Erntemaschinen zum Einsatz, die die Blätter vom stehenden Bestand abstreifen und die blattlosen Stängel auf dem Feld stehen lassen. Die Stängel können dann in einem zweiten Schritt geerntet (HATFIELD, 2015) und beispielsweise in der Wiederkäuerfütterung für trockenstehende Kühe oder in der Färsenaufzucht eingesetzt werden (SIKORA et al., 2019). Prototypen solcher Blattabstreifer werden vor allem für die LB-Ernte getestet und entwickelt (CURRENCE und BUCHELE, 1967; EDWARDS et al., 1979; SHINNERS et al., 2007; SIKORA et al., 2019). Marktreife Maschinen stehen bisher allerdings nicht zur Verfügung (HATFIELD, 2015). Auch die in der vorliegenden Dissertation untersuchten LB und RKB wurden mit einem Prototyp einer solchen Blattabstreif-Erntemaschine geerntet (Firma Trust'ing, Frankreich). Aufgrund eines Patentanmeldeverfahrens und eines Geheimhaltungsabkommens mit der Firma können leider keine genaueren Details zum Prototyp beschrieben werden.

HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016) untersuchten die Roh Nährstoff- und AS-Gehalte der Blattmasse und GP von Luzerne, Rotklee, Weißklee, Inkarnatklee und Perserklee. Durch die Blatt-Stängeltrennung reduzierten sich bei allen untersuchten Grünleguminosen die XF-Gehalte, während sich die XP- und AS-Gehalte erhöhten. Mit den dabei erreichten XP- und AS-Gehalten kann die Blattmasse von Grünleguminosen zur Protein- und AS-Versorgung in der ökologischen Monogastrierfütterung beitragen (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016).

Bei der Werbung von Grünleguminosen spielt insbesondere der Erntezeitpunkt eine wichtige Rolle, da mit fortschreitendem Vegetationsstadium der Pflanzen der XP-Gehalt sinkt und die Fasergehalte steigen (ÅMAN und NORDKVIST, 1983; BALDE et al., 1993; BUXTON, 1996; KARAYILANLI und AYHAN, 2016). Die Konzentration an XP sinkt dabei einerseits aufgrund von abnehmenden XP-Gehalten in Blättern und Stängeln und andererseits wegen des höher werdenden Stängelanteils in der Pflanze (BUXTON, 1996). Gleichzeitig steigen die Fasergehalte (steigende Zellwandkonzentration) der Stängel und in geringerem Ausmaß auch die der Blätter, wodurch die Verdaulichkeit sinkt (ALBRECHT et al., 1987; BUXTON, 1996).

Die Ernte in einem frühen Vegetationsstadium führt folglich zu einem proteinreicheren, weniger faserhaltigen und somit höher verdaulichen Futtermittel. Infolgedessen ist insbesondere für das Geflügel eine Ernte in einem frühen Vegetationsstadium (vor bzw. in der Knospe) anzustreben (WELTIN et al., 2014). Bei Weißklee spielt das Vegetationsstadium eine geringere Rolle, da dieser einen sehr hohen Blattanteil aufweist (BUXTON, 1996). Auch die Trennung der proteinreichen Blätter von den Stängeln bietet eine größere Unabhängigkeit vom Vegetationsstadium bei der Ernte (SIKORA et al., 2019).

Konservierung und Aufbereitung

Um Grünleguminosen ganzjährig als Futtermittel einsetzen zu können, ist eine Konservierung notwendig. Dafür kommen vor allem die Silierung und die Trocknung in Betracht, die beide sowohl für die GP als auch für die Blattmasse angewendet werden können.

Das Prinzip der Silierung beruht auf der Umwandlung der in den Pflanzen enthaltenen Kohlenhydrate zu Milchsäure durch Milchsäurebakterien, die auf der Pflanzenoberfläche anhaften. Die entstandene Milchsäure führt zur pH-Absenkung und zur Konservierung der Futterpflanzen. Elementar für diesen Prozess sind allerdings eine hohe Verdichtung und ein schneller Luftabschluss (GALLER, 2011). Für die Monogastrierfütterung hat sich dafür das Kurzhäckseln von Luzerne und Klee sowie die Silierung in Rundballen als vorteilhaft erwiesen. Durch den Einsatz spezieller Ballenpressen (LT Master, GÖWEIL, Kirchschlag bei Linz, Österreich) kann eine gute Silierung erreicht werden (WELTIN et al., 2014). Die relativ hohen, basisch wirkenden Protein- und Mineralstoffgehalte in Grünleguminosen wirken stark puffernd während des Silierprozesses. Infolge des gleichzeitig niedrigen Zuckergehalts gelten Luzerne und Klee daher als schwer vergärbare Futterpflanzen mit niedrigem „Z/PK-Quotienten“ (Zucker/Pufferkapazität-Quotient). Das Anwelken - Erhöhung der TM - von Futterpflanzen mit niedrigen Z/PK-Quotienten verbessert die Vergärbarkeit und es kann eine sichere Silierung erreicht werden (GALLER, 2011; LFL, 2016). Der höhere XP-Gehalt der Blattmasse von Grünleguminosen erschwert die Silierung zusätzlich. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass auch die Silierung von Blattmaterial möglich ist (SHINNERS et al., 2007; SIKORA et al., 2019).

Die Konservierung durch Trocknung basiert auf dem weitgehenden Entzug des in der Pflanze enthaltenen Wassers. In der Heißlufttrocknung werden dabei sehr hohe Temperaturen von 200 °C bis 800 °C am Eingang und 60 °C bis 95 °C am Ausgang der Trocknertrommeln erreicht (ADAPA et al., 2007). Die Einwirkung hoher Temperaturen kann allerdings zur Hitzeschädigung von Proteinen und AS

durch die Maillard-Reaktion führen. Während dieser mehrstufigen chemischen Reaktion bindet ein reduzierender Zucker an eine AS, hauptsächlich an die sehr reaktive ϵ -Aminogruppe von Lysin, aber auch an α -Aminogruppen terminaler AS in Proteinen (MARTINS et al., 2001). Durch die dabei entstehenden sogenannten Maillard-Produkte verringert sich die Verdaulichkeit der AS beim Masthuhn (NEWKIRK et al., 2003) und der ernährungsphysiologische Wert der Proteine ist reduziert (MARTINS et al., 2001). Eine weitere Trocknungsmethode könnte auch die Nutzung von überschüssiger Wärme aus Biogasanlagen darstellen. Ein Vorteil der künstlichen Trocknung ist die dadurch gewonnene größere Wetterunabhängigkeit bei der Ernte (LFL, 2016).

Die Gewinnung von Proteinkonzentraten aus dem geernteten Grünleguminosenmaterial stellt eine weitere Art der Aufbereitung dar. Das frische Erntematerial wird gepresst, wobei ein faserhaltiger Trester und ein proteinreicher Saft gewonnen werden. Im nächsten Schritt werden beispielsweise durch die Zugabe von Säuren (STØDKILDE et al., 2018) oder durch Dampferhitzung (GRELA und PIETRZAK, 2014) die im Saft enthaltenen Proteine ausgefällt. Durch Zentrifugation wird das koagulierte Protein vom restlichen proteinarmen Wasser getrennt. Zur Konservierung kann das gewonnene Proteinkonzentrat dann beispielsweise getrocknet werden. Sowohl die GP als auch die Blattmasse von Grünleguminosen kann zur Herstellung von Proteinkonzentraten verwendet werden (STØDKILDE et al., 2018).

Eigenschaften von Grünleguminosen

Die Verringerung des Einsatzes von Futtermitteln, die in Nahrungskonkurrenz zum Menschen stehen, ist von zentraler Bedeutung für mehr Nachhaltigkeit in der Nutztierhaltung (EISLER et al., 2014; SCHADER et al., 2015). Das Protein des in der ökologischen Masthühnerfütterung in großen Mengen eingesetzten Sojakuchens weist beispielsweise humanernährungstaugliche Anteile von 50 % auf. Verglichen mit Wiederkäuern, die dank ihres Vormagensystems sehr faserhaltiges - und damit für den Menschen nicht essbares - pflanzliches Material verdauen können, ist das Verdauungssystem des monogastrischen Huhns dem des Menschen ähnlich. Mit Blick auf die Nährstoffzusammensetzung sind die Anforderungen an Futtermittel von Masthühnern daher vergleichbar mit den Anforderungen des Menschen. Der Anteil von potenziell humanernährungstauglichem Protein in Masthühnerrationen macht 46 % aus (ERTL et al., 2016). Berechnungen zur Lebensmittelkonversionseffizienz für Protein (humanernährungstauglicher Output/humanernährungstauglicher Input) zeigen, dass diese für Masthühner lediglich 0,52 betragen. Der Einsatz von Grünleguminosen als Protein- und AS-Quelle für Masthühner könnte

folglich den Anteil an Futtermitteln, die in Nahrungskonkurrenz zur Humanernährung stehen, reduzieren und damit die Lebensmittelkonversionseffizienz für Geflügelfleisch verbessern.

HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016) prüften jeweils für die Leguminosenarten Luzerne, Rotklee, Weißklee, Inkarnatklee und Perserklee beispielhaft ausgewählte Sorten. Hierbei zeichnete sich neben Luzerne vor allem Weißklee durch einen hohen XP-Gehalt (g/kg TM) in der GP aus. Auch in den Gehalten an Met und Lysin (Lys) lag der Weißklee etwas höher als der Rotklee, in der Blattmasse zeigten hier jedoch Luzerne und Rotklee die höchsten Gehalte (g/kg TM). Sowohl in der GP als auch in der Blattmasse wies Weißklee höhere *in vitro* praecaecale (pc) Verdaulichkeitswerte für Met und Lys auf als Luzerne und Rotklee. Diese erreichten allerdings die höchsten XP-Erträge (dt/ha) für GP und Blattmasse (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). Da Weißklee aufgrund der niedrigen Wuchshöhe außerdem schwierig zu beernten ist, erscheinen Luzerne und Rotklee insbesondere für eine Schnittnutzung junger Aufwüchse zur Silagebereitung bzw. zur Trennung in Blatt und Stängel geeigneter. Aus diesen Gründen richtet sich der Blick in der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf den Einsatz von Luzerne (*Medicago sativa*)- und Rotkleeprodukten (*Trifolium pratense*) in der ökologischen Masthühnerfütterung.

2.1.3.2 Inhaltsstoffe und Futterwert von Luzerneprodukten

Inhaltsstoffe

Wie im vorherigen Kapitel dargestellt, können durch die Ernte, Konservierung und Aufbereitung unterschiedlicher Bestandteile der Luzerne verschiedene Luzerneprodukte gewonnen werden, die folglich auch Unterschiede hinsichtlich Inhaltsstoffen und Futterwert aufweisen.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Luzerneprodukte (Luzerne-GP, LS und LB) mit durchschnittlichen bis hohen Gehalten an XP und AS stellen beispielhaft die Ausstattung dieser Futtermittel mit wertbestimmenden Inhaltsstoffen (XP, Rohfett (XL), XF, Rohasche (XA), Stickstofffreie Extraktstoffe (NfE), Met, Lys) und AME_N-Gehalten dar.

Tabelle 1: Inhaltsstoff- und AME_N-Gehalte von Luzerne-GP, LS und LB (g/kg TM bzw. MJ AME_N/kg TM)

Merkmal	Luzerne (GP) ¹	Luzerne (GP) ²	LS ¹	LB ³	LB ²
XP	239	244	226	272	283
XL	25	-	25	51	-
XF	170	172	225	111	125
XA	115	-	124	111	-
NfE	451	-	400	455	-
Lys	13,0	13,1	11,0	13,1	17,4
Met	4,0	2,2	3,0	5,3	2,8
Lys/100 g XP	5,4	5,4	4,9	4,8	6,1
Met/100 g XP	1,7	0,9	1,3	1,9	1,0
AME _N ⁴	6,2	-	5,7	7,1	-

¹WELTIN et al. (2014)

²HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016)

³GRUHN und WIESEMÜLLER (1990)

⁴eigene Berechnungen nach WPSA (1989); Verwendung der Kalkulationsfaktoren für Luzernemehl (> 18 % XP)

Für die ökologische Masthühnerfütterung sind insbesondere die Gehalte an XP, Met und Lys sowie Faser von Interesse. In ökologisch und konventionell erzeugten Luzerne-GP fällt insgesamt eine große Spannweite der XP-Gehalte von 169 bis 325 g/kg TM auf (BALDE et al., 1993; YU et al., 2003; WELTIN et al., 2014; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016; LFL, 2019). Dabei wird der Einfluss des Vegetationsstadiums deutlich. Durch die Ernte vor der Blüte können XP-Gehalte von bis zu 325 g/kg TM in ökologischer Luzerne-GP erreicht werden (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). Im Verlauf von der frühen Knospe zur vollen Blüte

verringert sich der XP-Gehalt deutlich auf 183 g/kg TM (BALDE et al., 1993). Am Ende der Blüte werden dann teilweise Gehalte von nur 169 g XP/kg TM erreicht (LFL, 2019). Auch für Met und Lys werden unterschiedliche Werte berichtet (Met: 2,2-5,3 g/kg TM, Lys: 7,0-13,1 g/kg TM) (WELTIN et al., 2014; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). Die XF-Gehalte liegen je nach Vegetationsstadium im Bereich von 170 bis 331 g/kg TM (WELTIN et al., 2014; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016; LFL, 2019). Neben diesen Inhaltsstoffen fällt in der Luzerne auch der hohe Calciumgehalt (ca. 20 g/kg TM) auf (LFL, 2019). Der Phosphorgehalt liegt dagegen auf mittlerem Niveau (2,8 g/kg TM) (LFL, 2019). Darüber hinaus enthält die Luzernepflanze auch hohe Konzentrationen an Carotinoiden wie Xantophyllen und Carotin (PONTE et al., 2004a; CASTAÑEDA et al., 2005), mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Vitaminen (GAWEŁ und GRZELAK, 2012).

Für LS werden XP-Gehalte zwischen 165 und 245 g/kg TM berichtet, mit Met-Gehalten von 2,9-4,0 g/kg TM und Lys-Gehalten von 10,5-13,0 g/kg TM. Die XF-Gehalte liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der unsilierten GP (211-327 g/kg TM) (WELTIN et al., 2014; RITTESER und GRASHORN, 2015; LFL, 2019). RITTESER und GRASHORN (2015) verwenden die Bezeichnung Kleeegrassilage; aufgrund der Zusammensetzung (90 % Luzerne und 10 % Weißklee) wird in dieser Arbeit die Bezeichnung LS verwendet.

Durch die Blatt-Stängeltrennung bei Luzerne kann eine durchschnittliche Erhöhung des XP-Gehalts von 40 g/kg TM in der Blattmasse im Vergleich zur GP erreicht werden. Der durchschnittliche XP-Gehalt von LB lag in der Untersuchung von HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016) mit einer Vielzahl an Proben (Ernte vor der Blüte) bei 283 g/kg TM (Tabelle 1) - im Gegensatz dazu betrug der durchschnittliche XP-Gehalt der GP 244 g/kg TM. Allerdings kann auch der XP-Gehalt der Blattmasse zwischen 201 und 351 g/kg TM variieren (RITTESER und GRASHORN, 2015; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016; SIKORA et al., 2019), wobei auch hier mit fortschreitendem Vegetationsstadium niedrigere XP-Gehalte erzielt werden (SIKORA et al., 2019). Die Konzentration von Met kann zwischen 2,8 und 5,3 g/kg TM liegen, die von Lys zwischen 10,0 und 17,4 g/kg TM (GRUHN und WIESEMÜLLER, 1990; JENTSCH et al., 1991; RITTESER und GRASHORN, 2015; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). In der Untersuchung von HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016) bewirkte die Trennung der Blätter von den Stängeln eine durchschnittliche Reduktion der XF von 48 g/kg TM. LB enthalten damit im Vergleich zur GP deutlich weniger XF (111-202 g/kg TM) (GRUHN und WIESEMÜLLER, 1990; JENTSCH et al., 1991; RITTESER und GRASHORN, 2015; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016).

Informationen zur Nährstoffzusammensetzung von Luzerneblattsilage (LBS) existieren bisher kaum. Von einem Ausgangsmaterial (erstes Viertel der Blüte) mit 266 g XP/kg TM erzeugten SHINNERS et al. (2007) in einem Silierversuch LBS-Qualitäten von 215 g XP/kg TM ohne Silierzusatz und 254 g XP/kg TM unter Zugabe von Ameisensäure. Proteinkonzentrate von Luzerne enthalten im Vergleich zu LB oder LBS sogar noch höhere XP-Gehalte (514-678 g/kg TM) mit 10 g Met/kg TM und 31 g Lys/kg TM sowie weniger XF (1,2-6,3 g/kg TM) (KUZMICKY und KOHLER, 1977; KWIATKOWSKA et al., 2017).

Futterwert

Aus den in Tabelle 1 dargestellten AME_N-Werten von Luzerne-GP, LS und LB wird ersichtlich, dass die Luzerneprodukte nur einen geringen Beitrag zur Energieversorgung von Hühnern liefern und eher als energieverdünnend anzusehen sind. Die Gehalte an Met und Lys pro 100 g XP der aufgeführten Luzerneprodukte sind dabei auf einem vergleichbaren oder etwas höheren Niveau als das von Sojakuchen (1,5 g Met/100g XP; 5,9 g Lys/100g XP) (DLG, 2014). Im Vergleich zum Erbsenprotein (1,0 g Met/100g XP; 7,2 g Lys/100g XP) (DLG, 2014) weisen Luzerneprodukte sogar deutlich höhere Met-Gehalte auf.

Da in der vorliegenden Arbeit die Ermittlung der pcV von XP und AS in LS und LB einen Schwerpunkt bildete, sollen nachfolgend entsprechende Studien vorgestellt werden. In Tabelle 2 wird eine Übersicht zu pc Verdaulichkeitswerten für XP, Met und Lys der verschiedenen Luzerneprodukte Luzernemehl (LM; Luzerne-GP), LS und LB aus *in vitro* (Schwein) Untersuchungen und *in vivo* (Masthuhn) Untersuchungen gegeben.

Tabelle 2: Verdaulichkeit von XP, Lys und Met (praecaecale Verdaulichkeit) aus *in vitro* (Schwein) und *in vivo* (Masthuhn) Untersuchungen mit LM, LS und LB (Angaben in %)

Merkmal	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>					
	LM ¹	LB ¹	LM ³	LS ³ extrudiert	LS ² extrudiert	LS ²	LB ²	LB ³
XP	79	77	80	63	43	49	88	26
Lys	77	78	88	60	45	33	87	46
Met	78	78	93	53	50	48	93	41

¹HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016); LM von den Autoren selbst als Luzerne-GP bezeichnet; Verdaulichkeitswerte ermittelt mit aus dem Gastrointestinaltrakt des Schweines stammenden Verdauungsenzymen

²RITTESER und GRASHORN (2015)

³PLEGER et al. (2018)

In vitro Untersuchungen mit aus dem Gastrointestinaltrakt des Schweines stammenden Verdauungsenzymen zeigen sowohl für die GP als auch für die Blätter der Luzerne hohe Verdaulichkeitswerte für XP, Met und Lys (HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). *In vivo* ermittelten RITTESER und GRASHORN (2015) und PLEGER et al. (2018) die pcV von XP und AS für verschiedene Luzerneprodukte bei gleichem Alter der Tiere (Tag 42) und unter Anwendung derselben Methode wie sie auch in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Die pcV von XP, Met und Lys des LM ist dabei auf hohem, die der LS auf mittlerem Niveau. Für LB ermittelten RITTESER und GRASHORN (2015) sehr hohe pcV-Werte, während PLEGER et al. (2018) ein niedrigeres Niveau feststellten.

2.1.3.3 Inhaltsstoffe und Futterwert von Rotkleeprodukten

Rotklee weist im Vergleich zu Luzerne insgesamt etwas geringere Gehalte an XP, Met und Lys auf. Tabelle 3 stellt die Inhaltsstoffe von Rotklee-GP und RKS mit durchschnittlichem XP-Gehalt sowie von RKB mit durchschnittlichen XP- und AS-Gehalten bzw. RKB mit hohen XP- und AS-Gehalten dar.

Tabelle 3: Inhaltsstoff- und AME_N-Gehalte von Rotklee-GP, RKS und RKB (g/kg TM bzw. MJ AME_N/kg TM)

Merkmal	Rotklee (GP) ¹	Rotklee (GP) ²	RKS ¹	RKB ³	RKB ²
XP	222	225	193	338	268
XL	41	-	37	74	-
XF	190	172	230	114	130
XA	110	-	115	88	-
NfE	437	-	425	386	-
Lys	11,1	11,2	-	20,4	15,3
Met	3,6	1,9	-	5,5	2,5
Lys/100 g XP	5,0	5,0	-	6,1	5,7
Met/100g XP	1,6	0,8	-	1,6	0,9
AME _N ³	6,2	-	5,7	7,9	-

¹BEYER et al. (1977)

²HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016)

³GRUHN et al. (1983); RKB, gewonnen durch hohen Etagenschnitt, Material überwiegend aus RKB bestehend

⁴eigene Berechnungen nach WPSA (1989); aufgrund fehlender Kalkulationsfaktoren für Rotklee Verwendung der Werte für Luzernemehl (> 18 % XP)

Auch beim Rotklee fallen große Schwankungen im Nährstoffgehalt auf. Der Einfluss des Vegetationsstadiums wird im sinkenden XP-Gehalt bis 160 g/kg TM in der Mitte der Blüte und im steigenden XF-Gehalt auf 282 g/kg TM deutlich (LFL, 2019). Ähnlich wie Luzerne enthält auch Rotklee relativ hohe Mineralstoffgehalte (Calcium 17 g/kg TM, Phosphor 3,0 g/kg TM); der Calciumgehalt liegt aber etwas niedriger (LFL, 2019). Wie Luzerne enthält auch Rotklee hohe Gehalte an Carotinoiden (NOZIÈRE et al., 2006) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (VAN DORLAND et al., 2008).

Ähnliche XP-Gehalte (158-212 g/kg TM) wie für die unsilierte GP sind auch für die RKS zu finden (BEYER et al., 1977; BAYAT et al., 2010; PRESTO ÅKERFELDT et al., 2019). Wie aus Tabelle 3 ersichtlich wird, kann durch die Blatt-Stängeltrennung auch für die Blattmasse des Rotklees eine Aufkonzentrierung von XP und AS sowie eine Reduktion der XF erreicht werden (GRUHN et al., 1983; HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM, 2016). Analog zur Luzerne weisen Proteinkonzentrate

aus RKB hohe XP-Gehalte auf (379 g/kg) (AMEENUDDIN et al., 1983).

Futterwert

Rotklee leistet ebenfalls nur einen geringen Beitrag zur Energieversorgung beim Masthuhn (Tabelle 3). Wie am Beispiel der RKB (GRUHN et al., 1983) zu sehen ist, steigt der Energiebeitrag mit steigendem XP-Gehalt aber entsprechend an. Die Gehalte an Met und Lys pro 100 g XP der Rotklee-GP (BEYER et al., 1977) und der RKB (GRUHN et al., 1983) sind vergleichbar zu denen des Sojakuchens (1,5 g Met/100g XP; 5,9 g Lys/100g XP) (DLG, 2014) und belegen damit, dass Rotkleeprodukte bei entsprechender AS-Ausstattung ein großes Potenzial als Eiweißfuttermittel für die Masthühnerfütterung aufweisen.

Tabelle 4 stellt die von HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016) *in vitro* ermittelten pc Verdaulichkeitswerte für XP, Met und Lys von Rotklee-GP und RKB dar. Ergebnisse aus *in vivo* Studien zur pcV von Rotklee-GP, RKS oder RKB mit Masthühnern sind nicht bekannt. Wie die Luzerne-GP und LB weisen die Rotklee-GP und RKB eine hohe *in vitro* pcV für XP, Met und Lys auf.

Tabelle 4: Verdaulichkeit von XP, Lys und Met (praecaecale Verdaulichkeit) aus *in vitro* (Schwein) Untersuchungen mit Rotklee-GP und RKB (Angaben in %)

Merkmal	Rotklee-GP	RKB
XP	74	73
Lys	79	80
Met	77	76

¹HOISCHEN-TAUBNER und SUNDRUM (2016); ermittelt mit aus dem Gastrointestinaltrakt des Schweines stammenden Verdauungsenzymen

2.1.3.4 Antinutritive Inhaltsstoffe in Luzerne- und Rotkleeprodukten

Neben ihren wertvollen Inhaltsstoffen enthalten Luzerne und Rotklee auch verschiedene antinutritive Faktoren (ANF), wie Saponine, Trypsininhibitoren, Tannine sowie Rotklee zudem Polyphenoloxidase und Phenole.

Saponine

In Grünleguminosen wie Luzerne und Kleearten kommen Saponine als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe vor (CHEEKE, 1996). Insbesondere in der Luzerne werden diese als die bedeutsamsten ANF für monogastrische Tiere angesehen (KALAČ et al., 1996; SEN et al., 1998). In der Erforschung der in Grünleguminosen enthaltenen Saponine wurden vor allem die der Luzerne und weniger stark die des Klees betrachtet (CHEEKE, 1996). Daher sind in der Literatur wesentlich mehr Studien über Vorkommen, biologische Aktivität und antinutritive Wirkung der Luzernesaponine als der Rotkleesaponine zu finden. Es bleibt aber festzuhalten, dass auch Rotklee Saponine enthält (OLESZEK und JURZYSTA, 1986; OLESZEK und STOCHMAL, 2002).

Saponine bestehen aus einem hydrophoben Grundgerüst (Aglykon), das kovalent mit einem oder mehreren Zuckerresten verbunden ist (FRANCIS et al., 2002). Ihr chemischer Aufbau sei im Folgenden am Beispiel der Luzerne dargestellt. Die Luzernepflanze besitzt verschiedene triterpenoide Aglykone wie Hederagenin, Bayogenin, Soyasapogenole, Oleansäure, Medicagensäure und Zanhicsäure (HUHMAN und SUMNER, 2002; TAVA und AVATO, 2006) (Abbildung 1).

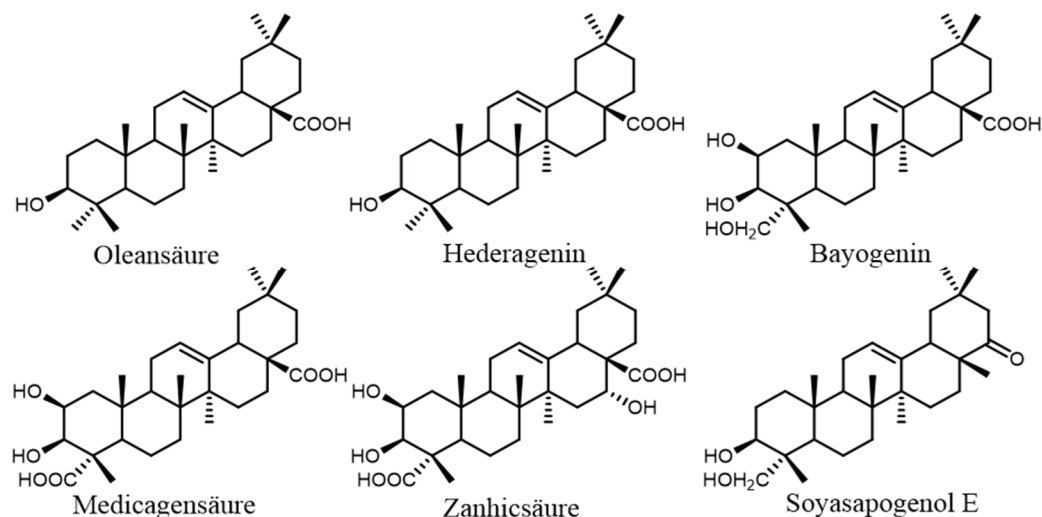


Abbildung 1: Strukturen verschiedener Aglykone der Luzernesaponine (eigene Darstellung)

Luzerne enthält vor allem monodesmosidische (vorwiegend an Position 3 substituiert) und bidesmosidische Saponine (an Position 3 und 28 substituiert), aber auch tridesmosidische Saponine (Substitution an Position 3, 23 und 28) mit verschiedenen Monosaccharidbausteinen wie D-Glucose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Galactose, D-Glucuronsäure und L-Rhamnose. Allgemein können die Luzernesaponine somit als eine komplexe Mischung aus mono-, bi- und tridesmosidischen Saponinen mit kurz- und langkettigen Saccharidresten beschrieben werden (OLESZEK et al., 1990; MASSIOT et al., 1991; OLESZEK et al., 1992; TAVA et al., 1993; OLESZEK, 1996; BIALY et al., 1999; HUHMANN und SUMNER, 2002; MAZAHERY-LAGHAB et al., 2011). Die Vielzahl und Komplexität der Saponine entsteht folglich durch die unterschiedlichen Aglykone, dem variierenden Aufbau der Seitenketten und deren Position am Aglykon (FRANCIS et al., 2002). Im Vergleich zur Luzerne existieren nur wenige Informationen zum chemischen Aufbau der Rotkleesaponine. OLESZEK und JURZYSTA (1986) identifizierten in Rotkleewurzeln Saponine der Aglykone Soyasapogenol B, C, D, E und F, während in den Samen des Rotklees Glykoside mit Soyasapogenol B gefunden wurden (OLESZEK und STOCHMAL, 2002).

Die biologische Aktivität beruht sowohl auf dem unpolaren Cholesterol-ähnlichen Aglykon als auch auf der Anzahl und Zusammensetzung der Zuckerreste. Abhängig von dieser chemischen Struktur weisen Saponine unterschiedliche biologische Aktivitäten auf (CHEEKE, 1971; OLESZEK et al., 1992; OLESZEK et al., 1994; OLESZEK, 1996; SEN et al., 1998). Wesentliche antinutritive Effekte auf monogastrische Tiere sind ein bitterer Geschmack (SEN et al., 1998), eine verringerte Futteraufnahme (CHEEKE, 1983; UEDA et al., 1996; UEDA und SHIGEMIZU, 2001; UEDA et al., 2004), eine verringerte Nährstoffverdaulichkeit und -absorption, vermehrte Cholesterolausscheidung, Hämolyse und letztendlich Wachstumsdepressionen (CHEEKE, 1983, 1996; FRANCIS et al., 2002).

Der bittere Geschmack und die adstringierenden und reizenden Eigenschaften der Saponine in Mund und Rachen, wie sie von Menschen berichtet wurden, werden als wesentliche Gründe für die reduzierte Futteraufnahme monogastrischer Tiere bei der Fütterung von luzernehaltigen Futtermischungen angesehen (CHEEKE, 1983, 1996; SEN et al., 1998). Bei einem Geschmackstest mit verschiedenen, aus der Luzernepflanze isolierten Saponinen nahmen Menschen das Zanhicssäure-Tridesmosid als das bitterste Saponin wahr (OLESZEK et al., 1992). Neben der verringerten Schmackhaftigkeit besitzen Saponine die Fähigkeit, Komplexe mit Cholesterol zu bilden. Bei der Bindung an Membransterole kommt es in der Folge zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran und zur Zellyse. Bei

Erythrozyten führt diese Eigenschaft zur Hämolyse (CHEEKE, 1971; JOHNSON et al., 1986) und kann bei intravenöser Gabe toxisch wirken (JOHNSON et al., 1986). Bei oraler Aufnahme gelangen Saponine allerdings nicht in den Blutkreislauf, sondern beeinflussen Verdauungs- und Absorptionsprozesse im Gastrointestinaltrakt (JOHNSON et al., 1986; GEE und JOHNSON, 1988; GEE et al., 1989; OLESZEK et al., 1994). Die Proteinverdaulichkeit wird hierbei negativ von Saponinen beeinflusst (FRANCIS et al., 2002). In diesem Zusammenhang können Saponine Komplexe mit Proteinen bilden (POTTER et al., 1993; IKEDO et al., 1996), deren *in vitro* Verdaulichkeit verringert ist (IKEDO et al., 1996). Saponine reduzieren außerdem die proteolytische Aktivität von Verdauungsenzymen wie Trypsin und Chymotrypsin (ISHAAYA und BIRK, 1965; SHIMOYAMADA et al., 1998). Weiterhin bilden Saponine auch im Gastrointestinaltrakt Komplexe mit Cholesterol aus der Nahrung und mit Gallensäuren, verhindern so deren Absorption und führen zu einer erhöhten Cholesterolausscheidung und in der Folge zu einem verringerten Plasmacholesterolgehalt. Auch die Komplexbildung zwischen Saponinen und Cholesterol in der Bürstensaummembran von Enterozyten könnte dazu beitragen (JOHNSON et al., 1986; GEE und JOHNSON, 1988). In der Folge werden Enterozyten permeabilisiert, die transmurale Potenzialdifferenz reduziert und die Nährstoffaufnahme gestört (JOHNSON et al., 1986; GEE und JOHNSON, 1988; GEE et al., 1989; OLESZEK et al., 1994). Bei einer *in vitro* Untersuchung von verschiedenen Luzernesaponinen reduzierten Zanhicsäure-Glykoside die transmurale Potenzialdifferenz am Rattendarm deutlich stärker als Glykoside der Medicagensäure (OLESZEK et al., 1994). Die Permeabilisierung führt zu Zellverlusten, Epithelschäden und einer erhöhten Zellproliferation (JOHNSON et al., 1986; GEE und JOHNSON, 1988; GEE et al., 1997).

Saponine kommen in verschiedenen Teilen der Pflanze wie Blättern, Blüten, Samen, Stängeln und Wurzeln vor (TAVA und AVATO, 2006). Ihre Konzentration ist allerdings in den Blättern höher als in den Stängeln (LIVINGSTON et al., 1977; KALAČ et al., 1996; SEN et al., 1998), wodurch die GP von Luzerne und Rotklee niedrigere Saponinkonzentrationen aufweist als deren getrocknete Blätter. Darüber hinaus werden Saponingehalt und -zusammensetzung von weiteren Faktoren wie dem Vegetationsstadium (SEN et al., 1998), Jahreszeit und Klima, aber auch dem Alter der Pflanzen, der Sorte (PECETTI et al., 2006) und dem Standort (SZAKIEL et al., 2011) beeinflusst. Auch die Silierung führt zu Änderungen im Saponingehalt (KALAČ et al., 1996; SZUMACHER-STRABEL et al., 2019). In einer Studie mit zehn verschiedenen Luzernesorten wurde der Gesamtsaponingehalt und die Saponinzusammensetzung untersucht. Der Gesamtsaponingehalt stieg dabei im

silierten Material aller zehn Luzernesorten im Vergleich zum frischen Material stark an. Bei der Analyse der einzelnen Saponine zeigte sich, dass es während der Silierung zu strukturellen und quantitativen Veränderungen im Saponingehalt kommt. Die Konzentration mancher Saponine sank erheblich, während die Konzentration anderer Saponine deutlich zunahm oder konstant blieb (SZUMACHER-STRABEL et al., 2019). Unterschiede im Saponingehalt zwischen getrockneten und silierten Luzerne- und Rotkleeprodukten könnten somit auch deren antinutritive Wirkung verändern.

Trypsininhibitor

Trypsininhibitoren sind Peptide, die im Gastrointestinaltrakt mit Trypsin Komplexe eingehen und damit die Proteinverdauung im Dünndarm hemmen (SIMON und ZENTEK, 2019c). Die Luzernepflanze enthält Trypsininhibitoren, die in den Blättern in höheren Konzentrationen vorkommen als in den Stängeln (CHANG et al., 1978; BROWN und RYAN, 1984; BROWN et al., 1985). NORIOKA et al. (1988) konnten in Rotklee Samen zwar weder einen Trypsininhibitor der Bowman-Birk-Familie noch der Kunitz-Familie identifizieren, aber es zeigte sich dennoch eine leichte trypsinhemmende Aktivität der Rotklee Samen. Auch in Extrakten der Rotkleepflanze wurde eine starke Trypsinhemmung festgestellt (MALIAR et al., 2011).

Tannine

Luzerne und Rotklee enthalten Tannine. Diese gehören der Stoffgruppe der Polyphenole an, bilden Komplexe mit Proteinen, hemmen die proteolytische Aktivität von Enzymen und reduzieren dadurch die Protein- bzw. AS-Verdaulichkeit (GRIFFITHS, 1979; JEROCH, 2019a). Der Tanningehalt in Luzerne und Rotklee ist allerdings eher niedrig (GOERITZ et al., 2009). Die Bedeutung von Tanninen als ANF in Luzerne und Rotklee kann daher vermutlich als gering betrachtet werden.

Polyphenoloxidase und Phenole in Rotklee

Die Blätter des Rotklee enthalten das Enzym Polyphenoloxidase (PPO) und Phenole (JONES et al., 1995a). In der intakten Pflanze sind diese normalerweise durch verschiedene Zellkompartimente getrennt. Durch Verletzen, Schneiden oder Zerkleinern der Blätter während der Ernte oder des Einsilierens können die beiden Bestandteile aber miteinander reagieren und die Phenole werden durch die PPO zu Chinon-Verbindungen oxidiert. Diese sind sehr reaktiv und können im Folgenden reversibel oder irreversibel an Proteine und AS binden (BITTNER, 2006). Verschiedene Studien belegen, dass die Aktivität der Rotklee-PPO eine

verringerte Proteolyse in RKS (JONES et al., 1995b; LEE et al., 2008) und im Pansen des Wiederkäuers (MERRY et al., 2006) bewirkt. Der Grund für diese reduzierte Proteinabbaubarkeit wird in der Bildung von Protein-Phenol-Komplexen gesehen, die weniger empfindlich gegenüber proteolytischen Vorgängen sind (WINTERS et al., 2008). *In vitro* Untersuchungen mit Trypsin, α -Chymotrypsin, Pepsin und Pankreatin belegen außerdem, dass die enzymatische Verdauung von Protein-Phenol-Derivaten negativ beeinflusst ist (KROLL et al., 2000; KROLL und RAWEL, 2001).

2.2 Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit beim wachsenden Geflügel

2.2.1 Methodik zur Bestimmung der praecaecalen Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit

Nicht alle der im Futter enthaltenen Nährstoffe werden verdaut und absorbiert, ein Teil davon wird wieder mit den Exkrementen ausgeschieden. Nährstoffe, die nicht im Kot wiedergefunden werden, gelten somit als verdaut. Das Verhältnis der verdauten Nährstoffmenge zur aufgenommenen Nährstoffmenge wird als Verdaulichkeit definiert (SIMON und ZENTEK, 2019b). Neben den unverdauten Nährstoffen enthält der Kot aber auch endogene Ausscheidungen wie Verdauungssekrete oder abgestoßene Darmzellen (STANGL, 2014). Im Kot gefundene AS sind somit zum Teil auch endogener Herkunft. In der Folge ergibt sich die Definition der "scheinbaren Verdaulichkeit". Bei Berücksichtigung dieser endogenen Ausscheidungen wird von der "wahren Verdaulichkeit" gesprochen, die für XP und AS entsprechend höher ist als die scheinbare Verdaulichkeit (KAMPHUES et al., 2009). Die Erfassung der endogenen Ausscheidungen erfordert allerdings zusätzliche Untersuchungen und ist besonders im Zusammenhang mit AS nicht unproblematisch, weshalb eine Verdaulichkeitsbestimmung, die ohne eine separate Ermittlung von endogenen Ausscheidungen auskommt, von Vorteil ist (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003).

Die XP- und AS-Verdaulichkeit kann prinzipiell sowohl durch die Sammlung von Exkrementen als auch durch die Entnahme des ilealen Chymus bestimmt werden (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003). Am Ende des Ileums ist die Dünndarmverdauung abgeschlossen, post-ileal finden jedoch noch mikrobielle AS-Umsetzungen statt, wodurch sich die Verdaulichkeitswerte zwischen ileal gewonnenem Chymus und Exkrementen unterscheiden. Aus diesem Grund wird die Methode der ilealen Verdaulichkeitsbestimmung als genauer und vorteilhafter angesehen (RAHARJO und FARRELL, 1984; TEN DOESCHATE et al., 1993; RAVINDRAN et al., 1999; KLUTH und RODEHUTSCORD, 2006a). Die Bestimmung der Verdaulichkeit bis zum Ende des Ileums wird als "ileale Verdaulichkeit" oder - wie im deutschen Sprachraum häufiger verwendet - als "praecaecale Verdaulichkeit" bezeichnet (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003).

Für die Messung der pc AS-Verdaulichkeit wird der Chymus aus einem bestimmtem Teil des Ileums, der als Darmabschnitt zwischen dem Meckel'schem Divertikulum und dem Übergang zu den Caeca/Colon definiert wird, entnommen. Bei Drittelung des Abschnitts zwischen Meckel'schem Divertikulum und 2 cm vor dem Übergang vom Ileum in die Caeca bzw. das Colon zeigte sich, dass die

Verdaulichkeitswerte im vorderen Drittel niedriger waren als in den beiden terminalen Dritteln (KLUTH et al., 2005b). Zur Bestimmung der pcV eines bestimmten Futtermittels sollte daher nur die Beprobung der letzten beiden Drittel des Ileums erfolgen (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003; KLUTH et al., 2005b; KLUTH und RODEHUTSCORD, 2006a). Durch den Abstand von 2 bis 4 cm zum Übergang zu den Caeca/Colon soll die Erfassung eventueller Rückflüsse von Chymus aus dem Dick- in den Dünndarm vermieden werden. Nach der Tötung der Tiere sollte der Chymus durch Ausspülen mit destilliertem Wasser entnommen werden, das Ausstreichen des Darms ist dabei wegen möglicher Sekret- oder Epitheleinträge in den Chymus zu vermeiden. Durch die Einmischung eines unverdaulichen Markers ins Futter kann das veränderte Verhältnis von Marker und AS in Futter und Chymus bestimmt und somit die verdaute Menge an AS errechnet werden (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003).

Die Bestimmung der pc AS-Verdaulichkeit von zu prüfenden Proteinfuttermitteln kann dann mittels Regressionsberechnung erfolgen (RODEHUTSCORD et al., 2004). Dieser Ansatz wurde auch für die vorliegende Dissertation verwendet. Die Beziehung zwischen der Menge der aufgenommenen AS und der Menge der bis zum Ende des Ileums verdauten AS lässt sich dabei durch eine lineare Funktion darstellen. Spezifische endogene AS-Ausscheidungen, die von der Menge und Herkunft des zu prüfenden Proteinfuttermittels abhängig und damit Bestandteil des Futterwerts sind, sind in der Steigung der linearen Regression enthalten. Basale endogene Verluste dagegen sind Bestandteil des Intercepts. Folglich stellt die Steigung der Regressionsgeraden ein unmittelbares Maß für die AS-Verdaulichkeit der zu prüfenden Proteinquelle dar (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003; RODEHUTSCORD et al., 2004; KLUTH und RODEHUTSCORD, 2006a). Für diesen methodischen Ansatz werden Futtermischungen erstellt, denen das zu prüfende Proteinfuttermittel in mehreren Zulagestufen eingemischt wird. Im Austausch wird Maisstärke entsprechend reduziert, sodass die Steigerung der AS-Menge in den Rationen nur aus dem zu prüfenden Proteinfuttermittel erfolgt (RODEHUTSCORD et al., 2004). Der methodische Aufwand ist zwar durch die Erstellung verschiedener Futtermischungen mit mindestens zwei Zulagestufen des zu prüfenden Proteinfuttermittels höher, dafür muss aber keine zusätzliche Messung der endogenen AS-Verluste durchgeführt werden (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003; RODEHUTSCORD et al., 2004).

2.2.2 Einflüsse auf die Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit beim wachsenden Geflügel

Die Verdaulichkeit von XP und AS eines Futtermittels wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. Tierseitig spielen hierbei beispielsweise die Geflügelart, das Geschlecht und das Alter eine Rolle (SIMON und ZENTEK, 2019c). Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der pcV von AS zwischen Gänsen (JAMROZ et al., 2002), Enten und Hühnern (JAMROZ et al., 2002; KLUTH und RODEHUTSCORD, 2006b) bestehen. Ebenso scheinen Verdaulichkeitswerte zwischen Puten und Hühnergeflügel nicht übertragbar zu sein (RODEHUTSCORD, 2007). Auch innerhalb einer Geflügelart kann die Verdaulichkeit eines Futtermittels unterschiedlich sein. So ist die pcV von AS mancher Futtermittel für Masthühner und Legehennen ähnlich, für andere Futtermittel aber unterschiedlich (HUANG et al., 2007). Eine Übertragbarkeit der Verdaulichkeitswerte von Masthühnern auf Legehennen scheint daher nicht gegeben (RODEHUTSCORD und KLUTH, 2003). Ebenso können das Geschlecht (TEN DOESCHATE et al., 1993; RAVINDRAN et al., 2004) und das Alter von Masthühnern (BATAL und PARSONS, 2002; HUANG et al., 2005; RITTESER und GRASHORN, 2015) die Verdaulichkeit beeinflussen. So ermittelten RITTESER und GRASHORN (2015) in einer extrudierten LS für einige AS niedrigere pc Verdaulichkeitswerte in der 3. Lebenswoche (LW) (Met 37 %, Lys 24 %) als in der 6. LW (Met 50 %, Lys 45 %) von langsam wachsenden Masthühnern. Dagegen waren XP und AS der nicht-extrudierten LS für die älteren Tiere weniger verdaulich (3. LW: Met 52 %, Lys 58 %; 6. LW: Met 48 %, Lys 33 %). Die pcV von XP und AS in LB war in beiden Altersstufen ähnlich (3. LW: Met 94 %, Lys 92 %; 6. LW: Met 93 %, Lys 87 %). Zwischen Masthühnern verschiedener genetischer Herkünfte sind Verdaulichkeitswerte hingegen übertragbar (GANZER et al., 2006).

Weiterhin spielen futterseitige Faktoren eine Rolle für die Verdaulichkeit eines Futtermittels (SIMON und ZENTEK, 2019c). Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Tannine und Trypsininhibitoren (SIMON und ZENTEK, 2019c) hemmen die XP- und AS-Verdaulichkeit. Wie bereits dargestellt, können auch Saponine die Verdauung und Absorption von XP und AS negativ beeinflussen.

Darüber hinaus verringern hohe Fasergehalte im Futter die Verdaulichkeit von XP und AS, da die Faser bzw. Zellwände eine Barriere für Verdauungsenzyme darstellen und so den Kontakt zwischen Enzymen und Nährstoffen beeinträchtigen (BACH KNUDSEN et al., 1993; JØRGENSEN et al., 1996; SIMON und ZENTEK, 2019c). Dabei spielt u. a. auch die Zusammensetzung der Faser eine Rolle (SIMON und ZENTEK, 2019c). Insbesondere bei Grünleguminosen ist auch das

Vegetationsstadium von Bedeutung für die Verdaulichkeit. Mit fortschreitendem Vegetationsstadium steigt die Zellwandkonzentration und Lignifizierung der Pflanzen, wodurch die Verdaulichkeit sinkt. Aufgrund der höheren Zellwandkonzentrationen in den Stängeln sinkt deren Verdaulichkeit dabei deutlich schneller als die der Blätter (BUXTON, 1996). Allerdings können Fasergehalte auch positive Effekte auf die Verdaulichkeit haben. KALMENDAL et al. (2011) berichten beim Einsatz von bis zu 30 % Sonnenblumenkuchen (XF-Gehalt 370 g/kg TM) in Alleinfuttermischungen von einer gesteigerten pcV von XP und Fett im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Sonnenblumenkuchen. Solche vorteilhaften Effekte von Faser auf die Nährstoffverdaulichkeit werden mit einer besseren Entwicklung des Muskelmagens und einer erhöhten Sekretion an Magensäure und Verdauungsenzymen in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang kann ein großer, gut entwickelter Muskelmagen die Motilität des Gastrointestinaltrakts verbessern und gastroduodenale Refluxes begünstigen (MATEOS et al., 2012).

Auch die Behandlung bzw. Bearbeitung, wie beispielsweise der Zerkleinerungsgrad und die Partikelgröße eines Futtermittels, können dessen Verdaulichkeit beeinflussen. Die pcV von XP in fein vermahlenen Erbsen ist dabei höher als die von grob vermahlenen (CRÉVIEU et al., 1997) und auch die pcV der AS in Sojaextraktionsschrot ist bei der feineren Vermahlung signifikant höher als bei der gröberen Vermahlung (2 versus 3 mm) (SIEGERT et al., 2018). Beim fein vermahlenen Mais dagegen ist die pcV von XP und AS numerisch niedriger als beim grob vermahlenen Mais (SIEGERT et al., 2018). Ebenso stellten KHERAVII et al. (2017) beim grob vermahlenen Mais eine bessere pcV von XP, zusammen mit einem signifikant höheren Muskelmagengewicht und einem etwas niedrigeren Muskelmagen-pH, im Vergleich zum fein vermahlenen Mais fest. Verantwortlich für die bessere Nährstoffverdaulichkeit könnte hier die für den groben Mais vermehrt notwendige Zerkleinerung im Muskelmagen sein, die - ähnlich wie bei höheren Fasergehalten im Futter - zu einer verbesserten Muskelmagenfunktion, zu einer verlängerten Exposition der Nährstoffe zu Verdauungsenzymen und zu einem für Verdauungsenzyme vorteilhaften pH-Wert führt (KHERAVII et al., 2017).

Wärmebehandlungen wie das Toasten von Sojaprodukten zur Inaktivierung der Trypsininhibitoren (SIMON und ZENTEK, 2019c) oder das Extrudieren (ARIJA et al., 2006; AHMED et al., 2014) können die XP- und AS-Verdaulichkeit verbessern. Dabei sollte aber eine Hitzeschädigung durch zu hohe Temperaturen vermieden werden, da die dabei möglicherweise entstehenden Maillard-Produkte (MARTINS et al., 2001) die AS-Verdaulichkeit verringern (NEWKIRK et al., 2003).

Natürlich setzt eine optimale Nährstoffverdauung auch einen gesunden und

intakten Gastrointestinaltrakt voraus. Diarrhoe-Erkrankungen wie beispielsweise die Kokzidiose, eine von einzelligen Darmparasiten der Gattung *Eimeria* hervorgerufene Erkrankung, lösen Darmläsionen aus (AMERAH und RAVINDRAN, 2015) und reduzieren die AS-Verdaulichkeit im Vergleich zu nicht infizierten Tieren (AMERAH und RAVINDRAN, 2015; ROCHELL et al., 2016).

2.3 Einsatz von Luzerneprodukten in der Masthühnerfütterung

Aufgrund der verschiedenen wertvollen Inhaltsstoffe der Luzerne, wie ihre relativ hohen Gehalte an XP bzw. AS und Carotinoiden, ist der Einsatz verschiedener Luzerneprodukte von großem Interesse in der Masthühnerfütterung.

Einige Studien belegen das Potenzial von Luzerneprodukten als Proteinfuttermittel für Masthühner. PLITZNER und LEITGEB (2004) untersuchten die Effekte verschiedener Mischungsanteile an LM in Alleinfuttermischungen auf die Mast- und Schlachtleistung von Masthühnern der Hybridmastlinie Ross in der konventionellen Masthühnerfütterung. Bei Mischungsanteilen von 0 %, 3 % und 6 % ergaben sich am Ende des Versuchs (35. Tag) weder für die Mast- und Schlachtleistung der Tiere noch für die organoleptische Beurteilung des Fleisches signifikante Unterschiede. Ein positiver Effekt wurde hier auch in der Imageverbesserung der Hähnchenfleischproduktion durch die Nutzung von Grünfutterflächen gesehen. Auch die Einmischung von Anteilen bis zu 8 % LM in Masthühnerrationen zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme und Mastleistung von Masthühnern im Vergleich zur Kontrollgruppe (LEIBER et al., 2017; JIANG et al., 2018). Aufgrund des niedrigen AME_N-Gehalts der Luzerne eignet sie sich besonders als Proteinkomponente in Futtermischungen mit niedrigerem Energielevel in der ökologischen Masthühnerfütterung (CARRASCO und BELLOF, 2013). Hier zeigten Futtermischungen mit LM-Anteilen von bis zu 12 % einen positiven Einfluss auf das Schlachtkörpergewicht und die Brustmenge von langsam wachsenden Masthühnern. Ebenso lösten Anteile von bis zu 10 % LB-Proteinkonzentraten in Alleinfuttermischungen keine signifikanten Gewichtsunterschiede bei Masthühnern im Vergleich zur luzernefrei versorgten Kontrollgruppe aus (KUZMICKY und KOHLER, 1977). Auch LS stellt ein geeignetes Proteinfuttermittel für ökologische Masthühner dar (WÜSTHOLZ et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass ökologische Masthühner hohe Silageaufnahmen von bis zu 10 % in der Aufzuchtphase und 30 % (jeweils bezogen auf die TM) in der Mastphase erreichen und dies auch effektiv in befriedigende Mastleistungen umsetzen können. Wie in dem von WÜSTHOLZ et al. (2016) durchgeführten Fütterungsversuch mit LS belegt wurde, führt die Aufnahme hoher Anteile an Luzerne, deren Fett reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist (GAWEŁ und GRZELAK, 2012; CARRASCO et al., 2018), außerdem zu höheren Konzentrationen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Masthühnerfleisch (CARRASCO et al., 2018). Darüber hinaus reduziert die Aufnahme von Luzerneprodukten den Cholesterolgehalt im Masthühnerfleisch (PONTE et al., 2004b; CARRASCO et al., 2018), da die in der Luzerne enthaltenen

Saponine im Chymus Komplexe mit Cholesterol bilden und dadurch dessen intestinale Absorption verhindern (OAKENFULL und SIDHU, 1990). Außerdem kann die Fütterung von Luzerne durch ihre hohen Gehalte an Carotinoiden die Färbung von Haut und Fleisch des Hähnchens positiv beeinflussen. Für viele Verbraucher ist hier besonders eine Gelbfärbung attraktiv (SUNDE, 1992; CASTAÑEDA et al., 2005). Die Einlagerung der Farbpigmente aus Luzernefuttermitteln führt dabei zu einer intensiven Gelbfärbung von Hähnchenprodukten (PONTE et al., 2004a; GAWEŁ und GRZELAK, 2012).

Jedoch werden auch Leistungsdepressionen beim Einsatz von Luzerneprodukten beschrieben. In einem Fütterungsversuch wurden die Effekte von Mischungsanteilen von 2 % und 6 % LM in Alleinfuttermischungen auf die Mastleistung von Masthühnern untersucht. Am Ende des Versuchs (Tag 38) erreichte die mit 6 % LM versorgte Gruppe ein um ungefähr 200 g und damit signifikant niedrigeres Gewicht als die Gruppe mit 2% LM (TKÁČOVÁ et al., 2011). Starke Leistungseinbußen wurden besonders im Einsatz von getrockneten LB beim jungen wachsenden Geflügel (Genotyp Hubbard-I-757) verzeichnet. Bei Vorlage von Alleinfuttermischungen mit 15 % LB-Anteil ab dem ersten Lebenstag erreichten die Küken an Tag 16 nur 51 % des Gewichts der luzernefreien Kontrollgruppe (WEINDL et al., 2018). RITTESER und GRASHORN (2015) beschreiben ebenfalls einen Leistungseinbruch bei Masthähnchen nach der Umstellung von einer luzernefreien Ration auf Rationen mit sehr hohen LB-Anteilen von 10 %, 30 % und 50 %. Für die Bestimmung der pcV von XP und AS der LB erhielten Masthühner die jeweiligen Futtermischungen im Zeitraum 15.-21. Tag (3. LW) oder 36.-42. Tag (6. LW). Unabhängig vom Alter der Tiere wurde eine deutlich niedrigere Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung der Gruppen mit 30 % und 50 % LB im Vergleich zur 10 % LB-Gruppe beobachtet. Die Gruppe mit 50 % LB zeigte sogar Gewichtsverluste. Verschiedene Studien belegen den Zusammenhang solcher Leistungsdepressionen mit Saponinen. PEDERSEN et al. (1972) untersuchten den Einsatz von 10 % LB von jeweils drei Linien von drei verschiedenen Luzernesorten bei Masthühnerküken (1.-25. Lebenstag). Die Linien waren züchterisch verändert (niedriger und hoher Saponingehalt) bzw. unverändert (mittlerer Saponingehalt). Im Vergleich der Mittelwerte der drei Sorten waren die Gewichtszunahmen der Tiere im Durchschnitt am höchsten (449 g) bei den Linien mit niedrigem Saponingehalt (0,36 %), gefolgt von den unveränderten Linien (436 g bzw. 0,66 %) und am niedrigsten (391 g) bei den Linien mit hohem Saponingehalt (1,38 %). Im Vergleich der Mittelwerte der drei Linien zeigte sich die gleiche Abstufung: die höchsten Zunahmen (446 g) wurden bei der Sorte mit dem

niedrigsten Saponingehalt (0,40 %) erreicht, die niedrigsten Zunahmen (399 g) bei der Sorte mit dem höchsten Saponingehalt (1,13 %). Ähnliche Ergebnisse brachte auch eine Untersuchung mit LB-Proteinkonzentraten mit hohem (1,17 %) bzw. niedrigem Saponingehalt (zwei verschiedene Sorten: beide 0,5 %) (AMEENUDDIN et al., 1983). Die beiden Proteinkonzentrate mit niedrigem Saponingehalt lösten keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe (616 g) aus, wenngleich numerische Unterschiede verzeichnet wurden (654 g versus 581 g). Die Tiere, die mit dem Proteinkonzentrat mit hohem Saponingehalt versorgt wurden, zeigten allerdings ein signifikant unterschiedliches Gewicht (283 g).

Wie bereits dargestellt, wird der bittere Geschmack und eine daraus resultierende verringerte Akzeptanz von Luzerneprodukten als eine der wichtigsten Ursachen für die niedrigere Futteraufnahme und Wachstumsdepressionen von Hühnern angesehen. Zwar zeigten Küken der Herkunft Weiße Leghorn keine unterschiedlichen Präferenzen zwischen LM mit niedrigem bzw. hohem Saponingehalt (CHEEKE et al., 1983), sie bevorzugten aber eindeutig eine luzernefreie Ration gegenüber einer Ration mit LM. Bei gleichzeitig zur Verfügung stehenden Rationen wurden bei einem Mischungsanteil von 30 % LM nur noch 8 % der täglichen Futteraufnahme aus der Luzerneration bezogen, der Rest aus der luzernefreien Basaldiät. Außerdem wurde in einem weiteren Versuch mit Hühnern, Wachteln, Puten und Gänsen durch die Einmischung des für Menschen bitter schmeckenden Chininsulfats belegt, dass die Aufnahme von Rationen mit Chininsulfat im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ist und Geflügel fähig ist, bittere Substanzen zu identifizieren.

3. PUBLIKATIONEN

3.1 Verdauungsversuch: Die praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren in Blättern und Silagen von Luzerne (*Medicago sativa*) und Rotklee (*Trifolium pratense*) bei Masthühnern

Das Manuskript „Precaecal digestibility of crude protein and amino acids from alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*) leaves and silages in broilers“ wurde am 6. Dezember 2019 zur Begutachtung im Journal „Animal Feed Science and Technology“ eingereicht und am 2. Februar 2021 von der Schriftleitung zur Veröffentlichung angenommen.

The manuscript entitled “Precaecal digestibility of crude protein and amino acids from alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*) leaves and silages in broilers” has been submitted for revision in the Journal “Animal Feed Science and Technology” on December 6th, 2019 and has been accepted for publication on February 2nd, 2021.

This article is published in:

Journal: Animal Feed Science and Technology

Volume: 275, May 2021

Authors: Lydia Pleger, Petra Nicole Weindl, Peter Andreas Weindl, Luz Salomé Carrasco, Céline Leitao, Minjie Zhao, Karen Aulrich, Gerhard Bellof

Title of article: Precaecal digestibility of crude protein and amino acids from alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*) leaves and silages in broilers

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114856>

© 2021 Elsevier B.V.

Precaecal digestibility of crude protein and amino acids from alfalfa (*Medicago sativa*) and red clover (*Trifolium pratense*) leaves and silages in broilers

Lydia Pleger^{a*}, Petra Nicole Weindl^a, Peter Andreas Weindl^a, Luz Salomé Carrasco^a, Céline Leita^b, Minjie Zhao^c, Karen Aulrich^d, Gerhard Bellof^a

^aUniversity of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf, Faculty of Sustainable Agriculture and Energy Systems, Am Staudengarten 1, 85354 Freising, Germany

^bTwistaroma, 300 Bd Sébastien Brant CS 10413, 67412 Illkirch, France

^cUniversity of Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France

^dJohann Heinrich von Thünen-Institute, Institute of Organic Farming, Trenthorst 32, 23847 Westerau, Germany

*Corresponding author:

Lydia Pleger, University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf, Faculty of Sustainable Agriculture and Energy Systems, Am Staudengarten 1, 85354 Freising, Germany; E-mail: lydia.pleger@hswt.de

Submitted to Animal Feed Science and Technology in December 2019.

Highlights

- Precaecal digestibility of nutrients from forage legumes was estimated in broilers.
- Amino acids from alfalfa and red clover whole plant silages were highly digestible.
- Amino acids from dried alfalfa and red clover leaves were less digestible.
- Anti-nutritional saponins possibly affected the digestibility of the leaf products.
- High amounts of a zanhic acid glycoside were found in alfalfa leaves.

Abstract

The aim of the present study was to determine the precaecal (pc) digestibility of crude protein and amino acids from organically produced alfalfa and red clover leaves and whole plant silages by a linear regression approach in slow-growing male Hubbard JA-757-broilers. Dried alfalfa leaves (AL; 219 g crude protein/kg dry matter (DM)), dried red clover leaves (RCL; 262 g crude protein/kg DM), alfalfa silage (AS; 240 g crude protein/kg DM) and red clover silage (RCS; 190 g crude protein/kg DM) were included in the diets at the levels of 100, 150 and 200 g/kg respectively at the expense of maize starch. Titanium dioxide was used as an indigestible marker for digestibility estimation. On day 41/42, digesta was sampled pen-wise from the terminal two thirds of the intestine section between Meckel's diverticulum up to 2 cm anterior to the ileocaeca-colonic junction. Feed intake did not differ significantly between feeding groups. All broilers grew during the experimental phase of digestibility estimation (day 30-41/42). The pc crude protein and amino acid digestibility of alfalfa and red clover leaves was lower than of alfalfa and red clover silages. Methionine was less digestible in AL (0.61) and RCL (0.73) than in AS (0.84) and RCS (0.99). This tendency was also observed for lysine (AL 0.49, RCL 0.61, AS 1.00, RCS 0.88) as well as for other amino acids. Anti-nutritional factors, e.g. saponins, were suspected of being responsible for the lower pc digestibility of the leaf products. The saponin analysis showed a higher content of medicagenic acid glycosides in AS than in AL, whereas a higher content of a zanhic acid glycoside was found in AL than in AS. Differences in saponin contents suggest that certain individual saponins, e.g. zanhic acid glycosides, might have a more negative effect on crude protein and amino acid digestibility than other saponins.

Keywords: ileal; forage legume; anti-nutritional; saponin; chicken; organic farming

Abbreviations: AA, amino acid(s); AL, alfalfa leaves; AME_N, apparent metabolizable N-corrected energy; AS, alfalfa silage; CF, crude fiber; CP, crude protein; DM, dry matter; KOH, potassium hydroxide; Lys, Lysine; Met, Methionine; P1, phase 1; P2, phase 2; P3, phase 3; pc, precaecal; pcd, precaecal digestibility; RCL, red clover leaves; RCS, red clover silage;

Introduction

The organic broiler nutrition is still challenged by legal requirements for home-grown and completely organic diets. The supply of protein and amino acids (AA), especially of the first limiting AA methionine (Met) and lysine (Lys), with home-grown organic protein sources is still difficult. EU guidelines also demand the addition of roughage to poultry (European Union 2007; 2008). As part of the crop rotation in organic farming, forage legumes like alfalfa and red clover can provide high yields of crude protein (CP) and AA, especially Met. Due to their considerable CP and AA contents, alfalfa (in g/kg dry matter (DM); CP 244, Met 2.20, Lys 13.1) and red clover (in g/kg DM; CP 225, Met 1.91, Lys 11.2) could be valuable protein and AA sources in broiler nutrition (Hoischen-Taubner and Sundrum, 2016). Thus, these forage legumes could replace soybean cake, which is still the dominant protein source in organic broiler diets. However, whole plant material contains a high crude fiber (CF) content of 210 g/kg DM or more (Sauvant et al., 2004), which may have negative effects on CP digestibility. Hoischen-Taubner and Sundrum (2016) showed that the separation of leaves from stems results in higher CP contents (in g/kg DM; alfalfa: +40, red clover: +42) and lower CF contents (in g/kg DM; alfalfa: -48, red clover -42). Nevertheless, the high potential of alfalfa silage of the whole plant as home-grown CP and CF source has already been proved in the organic feeding of broilers (Wüstholtz et al., 2016). The *in vitro* prececal (pc) CP and AA digestibility of alfalfa and red clover was high in leaves and whole plants (Met 0.76-0.78, Lys 0.77-0.80) (Hoischen-Taubner and Sundrum, 2016). In an *in vivo* study with ISA JA 957 chickens, Ritteser and Grashorn (2015) found lower pc CP and AA digestibility results in clover silages (extruded/not extruded; Met 0.50/0.48, Lys 0.45/0.33) but very high digestibility values in dried alfalfa leaves (Met 0.93, Lys 0.87).

Apart from their valuable CP and AA concentrations, these forage legumes contain anti-nutritional factors such as trypsin inhibitors (Brown et al., 1985), phenols and polyphenol oxidase (red clover) (Winters et al., 2008) and saponins. Saponins especially are considered to be the main anti-nutritional substances in alfalfa (Sen et al., 1998). Reduced feed intake due to bitter taste, growth depression and an impaired nutrient digestion and absorption are biological effects described in this context (Cheeke, 1983; Cheeke, 1996). Szumacher-Strabel et al. (2019) reported that ensiling of alfalfa can lead to structural and quantitative changes of individual saponins. Thus, the nutrient digestibility of dried and ensiled material may vary.

The objective of this study was to determine the pc CP and AA digestibility of dried alfalfa leaves (AL), dried red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS; whole plant)

and red clover silage (RCS; whole plant) in six-week-old broiler chickens by linear regression (Rodehutscord et al., 2004). Furthermore, this study aimed to evaluate differences in individual saponin contents between AL and AS.

Material and methods

Test feedstuffs

The test feedstuffs AL, RCL, AS and RCS formed the basis of this investigation (Table 1). All test feedstuffs were cultivated according to the current EU eco-directives Council Regulation (EC) No 834/2007 and Commission Regulation (EC) No 889/2008 (European Union, 2007; 2008). For the production of the AS (cultivar Plato, 3rd cut, bud stage), a population of alfalfa was mowed in July 2017, wilted for one day and chopped to a theoretical chopping size of 6 mm by a forage harvester (CLAAS, Jaguar 900 Speed Star; Germany). Afterwards, this material was compressed and ensiled using a round baler of the company GÖWEIL (Type LT-Master, Austria). The RCS (cultivar Titus, 2nd cut, just before the bloom stage) was harvested in July 2017 and provided as round bale silage by the Johann Heinrich von Thünen-Institute, Institute of Organic Farming, Germany. AL (cultivar Plato, 4th cut, middle of the bloom stage) and RCL (cultivar Titus, 4th cut, start of the bloom stage) were harvested using a special leaf-harvesting machine (Co. Trust'ing, France) in September 2017. Both leaf materials were dehydrated using hot air in a forage drying unit (Futtertrocknung Lamerdingen eG, Germany). Drying temperature ranged between 200-600°C at the entrance and 100°C at the end of the drying drum. Both leaf batches were finely ground to meal.

Experimental design and diets

The experiment was divided into three feeding phases: Phase 1 (P1, day 1-21), phase 2 (P2, day 22-28) and phase 3 (P3, day 29-41/42). In P1, the chickens were fed a commercial organic starter diet (per kg DM of diet: Apparent metabolizable N-corrected energy (AME_N) 12.8 MJ, CP 250 g, Met 4.43 g, Lys 12.2 g). Due to high CF contents and the possible presumption of anti-nutritional substances (e.g. saponins) in alfalfa and red clover, the experimental design differed from the common methodology of pc digestibility estimation (Rodehutscord et al., 2004; Kluth et al., 2005a). To avoid a sudden feed change from the starter to the experimental diets, an adaption period to the uncommon test feedstuffs was implemented. Therefore, diets of P2 (P2_AL, P2_RCL, P2_AS, P2_RCS) contained 150 g/kg alfalfa or red clover products, except the control group (P2_C) (Table 2). The pc digestibility was determined in P3.

Diets of P2 and P3 were produced in the facilities of the University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf (Germany). Silages were extruded (Bioextruder Lehmann Maschinenbau GmbH, Pöhl, Germany) and treated with

propionic acid/water (99.5/0.5, v/v; BASF, Germany) according to the manufacturer's information to facilitate blending with the concentrates and to prolong the durability of the silage-concentrate mixtures. Diets of P2 were designed to be isocaloric and isonitrogenous (Table 2). In total, 12 diets (AL1-3, RCL1-3, AS1-3, RCS1-3) served for the estimation of the pc digestibility of CP and AA in P3. The basal diet was based on soybean cake, dehulled sunflower cake, peas, maize, wheat and maize starch (Table 3). Free AA were added to the basal diet to meet or exceed the recommendations of the GfE (GfE, 1999). All diets contained Titanium dioxide (TiO_2) as an indigestible marker at a level of 5 g TiO_2 /kg. The respective alfalfa or red clover products were included in the diets at the levels of 100, 150 and 200 g/kg respectively, at the expense of maize starch. Hence, the difference in the CP and AA content of the diets resulted only from the test feeds (Table 4). All diets were pelleted without steam through a 3-mm die.

Animals and housing

The experiment was carried out at the Research Farm Zurnhausen of the University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf (Germany) and was approved by the University Animal Welfare Committee in accordance with the animal welfare legislation. Male broiler chickens (Hubbard JA-757, Brüterei Hölzl GmbH & Co. KG, Moosburg, Germany) were raised in floor pens on wood shavings and vaccinated against Infectious bursal disease, Marek's disease, Avian infectious bronchitis, Newcastle Disease and Coccidiosis. No coccidiostatics were used. Feed and water were offered *ad libitum*. The stable was thermostatically controlled, heat lamps were applied during the first 14 days. The temperature was set at 30°C during the first two days before being reduced stepwise to 21°C on day 21. Artificial lighting was continuously provided for the first 24 h and then reduced stepwise to 16 h per day.

At the beginning of the experiment, the average group weight was equal concerning mean value and standard deviation. To reduce the within-pen variation in body weight, chickens were weighed and the number of chickens per pen was reduced from 12 to 9 on day 14. During the first 21 days after hatching, the birds received a commercial organic starter diet. On day 21, chickens were weighed and diets of P2 (12 replicates for P2_AL, P2_RCL, P2_AS, P2_RCS, 8 replicates for P2_C; 9 chickens per pen) were provided. Group P2_C was removed from the experiment on day 28 as it should only function as a control group during the adaption period (P2). Four replicates of each of the remaining P2 feeding groups were assigned to the respective diets of P3 (P2_AL to AL1-3, P2_RCL to RCL1-3, P2_AS to AS1-3, P2_RCS to RCS1-3). On day 30, the bedding was removed and

the birds were placed on plastic slats in order to avoid the intake of excrements or bedding during the experimental phase of digestibility estimation (day 30-41/42). During the experiment, animal losses were monitored daily. Feed intake (per pen) and individual body weights were recorded after each feeding phase. The average body weights per pen were determined on the basis of individual body weights. The calculation of feed conversion rate was based on body weights and feed intake in consideration of animal losses. On day 41 and 42 all broilers were killed using CO₂ asphyxiation (two replicates of each diet on each slaughter day). For the digesta sampling the intestine section between Meckel's diverticulum up to 2 cm anterior to the ileocaeca-colonic junction was isolated and cut into thirds (Kluth et al., 2005b). The terminal two thirds of this section were flushed with distilled water. The content was pooled for all broilers of one pen, immediately frozen and freeze-dried.

Chemical analyses

The analysis of DM and crude nutrients, including sugar and starch, in the test feedstuffs and diets were carried out according to Commission Regulation No 152/2009 (European Union, 2009). Therefore, the samples were ground through a 1.0 mm sieve. For analysis of AA, minerals, TiO₂ and saponins all samples were ground through a 0.5 mm sieve. The AA contents in the feedstuffs and diets were analyzed by HPLC according to Commission Regulation No 152/2009 (European Union, 2009) regarding sample preparation via oxidation and hydrolysis. The subsequent derivatization and chromatography were performed according to Cohen and Michaud (1993). The adapted analytical procedure was recently described in detail by Witten et al. (2019). Feedstuffs were additionally analyzed for minerals after microwave assisted digestion and determination via atomic absorption spectroscopy. However, the phosphorus content was examined photometrically according to Commission Regulation No 152/2009 (European Union, 2009). Protein solubility in potassium hydroxide (KOH) of the feedstuffs and diets was examined according to Araba and Dale (1990). The CP and AA analysis in digesta was carried out according to Commission Regulation No 152/2009 (European Union, 2009). Concentrations of TiO₂ in the diets and digesta were determined with the inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) after acid hydrolysis.

Saponins in the test feedstuffs AL and AS were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) in the laboratory Twistaroma, Illkirch, France, as described recently by Pleger et al.

(2020). In short, saponins were extracted, in triplicate, from 200 mg of dried samples in ethanol/water (80/20, v/v) containing 18 µg/mL of umbelliferone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) used to calculate the relevant content of each saponin. The relevant content of the major saponins was calculated based on the relative peak areas (saponin/umbelliferone) and expressed as equivalent umbelliferone (µg/g DM). Raw UPLC–HRMS data files (.mzXML) were processed in R statistical language (version 3.5.2, <http://www.r-project.org/>) using the open-free XCMS (Tautenhahn et al., 2008) and CAMERA R-packages. Saponins were putatively characterized by comparing the recorded exact mass with data from Twistaroma in-house database as well as with reference literature.

Calculations and statistics

Using the analyzed contents of CP, AA and TiO₂ in the diet and digesta, the apparent pc digestibility coefficients of CP and AA of the diets were calculated (on pen basis) according to the following equation:

$$\text{Apparent pc digestibility coefficient} = 1 - [(TiO_2 \text{ Diet} * Item \text{ Digesta}) / (TiO_2 \text{ Digesta} * Item \text{ Diet})]$$

where TiO_{2Diet} and TiO_{2Digesta} represent the respective concentrations of TiO₂ in the diet and the digesta samples, and Item_{Diet} and Item_{Digesta} represent the concentrations of CP or the respective AA in the diet and the digesta samples.

The daily intake of CP and AA (g/d) was determined as the feed intake (g DM/d; day 30-41/42) multiplied by the analyzed CP and AA concentrations in the diet. The amount of CP and AA (g/d) digested up to the terminal ileum was calculated as the product of CP and AA intake and the digestibility determined for the respective pen. A linear regression was applied between the daily intake of CP and AA and the digested amount of CP and AA to calculate the digestibility coefficients of CP and AA of the test feedstuffs (Rodehutscord et al., 2004). The slope of the regression was taken as a measure of the pc digestibility of CP and AA for the respective test feedstuff (AL, RCL, AS, RCS).

The broiler performance data (feed intake (g DM/d), body weight (g), daily weight gain (g), feed conversion rate (kg/kg)) were analyzed by analysis of variance, using the General Linear Model procedure of SPSS (2017). Significant differences between means were determined using the Tukey's multiple comparison test. Results are expressed as mean ± standard deviation. Probability values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Linear regressions and differences between the slopes were tested for significance

using the linear regression procedure of SPSS (2017).

Results

AL contained lower CP, Met and Lys concentrations (219, 3.64 and 13.1 g/kg DM respectively) than RCL (262, 4.25 and 14.2 g/kg DM respectively). CP, Met and Lys concentrations in AS (240, 3.65 and 11.7 g/kg DM respectively) were higher than in RCS (190, 2.83 and 9.8 g/kg DM respectively) (Table 1). Protein solubility in KOH was highest in AS (0.56), whereas AL and RCS showed lower results (0.40 and 0.38). The measured protein solubility of RCL was at a very low level (0.16). The occurrence of 34 saponin compounds in the test feedstuffs AL and AS was proved in the saponin analysis via UPLC-HRMS. The relative contents of the nine major putatively identified saponins are presented in Table 5. In AS, particularly high contents were found for medicoside H, medicagenic acid 3-O- β -D-glucuronide and 3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagenic acid (209, 242 and 138 equivalent umbelliferone μ g/g DM respectively; saponin abbreviations see Table 5). Lower contents of these saponins were measured in AL (84.2, 89.3 and 101 equivalent umbelliferone μ g/g DM respectively). In contrast, a high content of HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-Zanhic acid was detected in AL, whereas low amounts of this saponin were found in AS (200 versus 12.4 equivalent umbelliferone μ g/g DM respectively).

With a few exceptions, feed analysis showed a high compliance between the calculated and realized nutritional composition of the diets. Compared with the planned values (13.9 MJ/kg DM of diet) P2_AS and P2_RCS were lower in AME_N (13.4 and 13.0 MJ/kg DM of diet). The Lys/AME_N relation in P2_RCS was slightly lower in contrast to the other diets but still in agreement with the recommendations (0.72) of the GfE (1999).

The animals showed a good health status throughout the experiment. Mortality was generally low (no losses in P2 and one loss during P3). There were no significant differences in feed intake between the feeding groups (Table 6 and 7). All feeding groups gained weight in P2 and P3.

The pc digestibility of CP from AS (0.88) and RCS (0.70) was higher than from AL (0.51) and RCL (0.50) (Table 8). AA were generally more digestible in AS (Met 0.84, Lys 1.00) and RCS (Met 0.99, Lys 0.88) than in AL (Met 0.61, Lys 0.49) and RCL (Met 0.73, Lys 0.61). Within the group of essential AA, threonine and valine in AL were poorly digestible (both 0.40). The pc CP and AA digestibility ranged widely within all test feedstuffs, especially within AL (e.g. arginine 0.62, cystine 0.21) and RCL (e.g. arginine 0.78, valine 0.12). However, the coefficients of

determination (r^2) of valine in RCL (0.03) and cystine in AL (0.15), RCL and AS (both 0.27) were low and, therefore, the estimated pc digestibility of these AA seems to be implausible or at least not very reliable.

Discussion

The CP and AA concentrations of AL and RCL (Table 1) were comparable to those described in literature (in g/kg DM; AL: CP 201-339, Met 2.76-3.10, Lys 10.0-17.4; RCL: CP 217-311, Met 2.45, Lys 15.3) (Ritteser and Grashorn, 2015; Hoischen-Taubner and Sundrum, 2016). The CP content of the tested AS was slightly higher compared to earlier reports of organically produced clover silages with 900 g/kg alfalfa and 100 g/kg white clover (in g/kg DM; CP 204-226, Met 2.90-3.60, Lys 10.5-11.0) (Ritteser and Grashorn, 2015; Wüstholtz et al., 2016). The test feedstuff RCS showed a rather low CP content (190 g/kg DM) but fell within the range of reports of organically and conventionally produced RCS (158-212 g/kg DM) (Bayat et al., 2010; Presto Åkerfeldt et al., 2019). However, harvesting in an earlier stage can lead to higher CP and AA contents and should be aspired in the production of alfalfa and red clover products for monogastrics.

Despite there being no significant differences in feed intake, significant differences in body weights between the feeding groups were registered after P2. These differences might be explainable by differences in nutritional composition of the diets (e.g. lower AME_N and Lys/AME_N relation in P2_RCS) or in pc digestibility of CP and AA from test feeds. However, P2 diets were only fed for 7 days and, therefore, performance data have to be interpreted with care. Nevertheless, the introduction of 150 g/kg of the respective test feeds in the diets allowed the adaptation of the broilers to the uncommon feedstuffs. It also showed that weight losses were rather not to be expected during digestibility estimation in P3. As the results in Table 7 show, this expectation was met.

Higher pc CP and AA digestibility values were determined for AS and RCS than for AL and RCL (Table 8). Regarding the lower CF content in leaf products, higher pc digestibility results for AL and RCL than for AS and RCS were expected. However, the CF content of RCS was almost as low as of AL (182 versus 174 g/kg DM). Nevertheless, high pc CP and AA digestibility values were determined for AS, showing the highest CF content (273 g/kg DM). Whole plant silages as well as leaf products, containing leaves and remaining parts of stems, represent very heterogeneous feedstuffs. This heterogeneity is considerably higher compared to grain legumes and might explain, at least partly, the varying r^2 -values.

Regarding the essential AA, particularly the low pc digestibility of threonine and valine of AL (both 0.40) has to be considered. In comparison, Ganzer et al. (2017) determined a pc digestibility of 0.79 for threonine and 0.87 for valine in organically produced soybean cake with slow-growing broilers (ISA J-257). With regard to the

contents of the first limiting AA Met and Lys of AL (3.64 and 13.1 g/kg DM) (Table 1) and soybean cake (6.5 and 29.3 g/kg DM) (Ganzer et al., 2017), 2 g/kg DM AL could replace 1 g/kg DM soybean cake in diets. Thus, 2 g/kg DM AL would contribute the same amount of threonine and valine (19.4 and 22.0 g/kg DM) as 1 g/kg DM soybean cake (19.5 and 22.7 g/kg DM) to diets but only 7.7 and 8.8 g/kg DM digestible threonine and valine compared to 15.4 and 19.7 g/kg DM in soybean cake. Consequently, levels of up to 4 g/kg DM AL would be necessary to substitute 1 g/kg DM soybean cake in diets if threonine or valine contents were marginally present in diets. Hence, the low pc digestibility of threonine and valine in AL could lead to a restriction in the feeding of AL to broilers.

Information on the digestibility of alfalfa and red clover products in broilers is quite limited. Hoischen-Taubner and Sundrum (2016) evaluated the pc digestibility of alfalfa and red clover leaves and whole plants by an *in vitro* method. They found high estimates of pc CP and AA digestibility for all feedstuffs (Met 0.76-0.78, Lys 0.77-0.80). However, the applied enzymes pepsin and pancreatin originated from the gastrointestinal tract of pigs, which might result in divergent results between *in vivo* and *in vitro* studies (Hoischen-Taubner and Sundrum, 2016). In general, the utilization of an *in vitro* method adapted to chickens probably leads to a more precise simulation of chickens' digestion and to different digestibility estimates for such feedstuffs. Moreover, environmental influences and other processes in the living organism, such as the intestinal reaction to anti-nutritional substances, are not reflected in *in vitro* digestibility methods.

Ritteser and Grashorn (2015) determined the pc digestibility of dried AL and two clover silages of 900 g/kg alfalfa and 100 g/kg white clover (extruded/not extruded) by linear regression in ISA JA 957 chickens on day 42. The CP and AA of AL were highly digestible (Met 0.93, Lys 0.87), whereas the determined pc digestibility of CP and AA of the clover silages were lower (extruded/not extruded: Met 0.50/0.48, Lys 0.45/0.33). Ritteser and Grashorn (2015) suspected the high CF content of the clover silages (extruded/not extruded, in g/kg DM: 214/211) to be a possible reason for the lower pc digestibility values. However, AL showed similar CF contents (202 g/kg DM) but higher pc digestibility results. The feed intake of groups fed diets containing higher levels of AL decreased, which resulted in lower weight gains (100 versus 300 g/kg AL) and weight losses (500 g/kg AL). In our opinion, the very high CP and AA pc digestibility results determined for AL in the study by Ritteser and Grashorn (2015) have to be regarded carefully due to the reduced weight gains and weight losses during the feeding of AL. In the present study, no significant differences in feed intake were found and all feeding groups gained weight during

P3 (Table 7). In contrast to the study from Ritteser and Grashorn (2015), we found higher pc CP and AA digestibility results for AS, containing high CF contents (273 g/kg DM), and lower pc CP and AA digestibility values for AL, having low CF contents (174 g/kg DM). This indicates that other factors than high CF contents must have influenced the pc digestibility of the tested AL and AS.

It is known that high amounts of dietary fiber in diets can reduce digestibility. Nevertheless, the inclusion of moderate amounts of dietary fiber could have positive effects on nutrient digestibility in poultry. As described by Mateos et al. (2012), this effect might be related to a well-developed gizzard that favors gastroduodenal refluxes and increases the secretion of digestive juices. However, the gastrointestinal development is affected by type and particle size of dietary fiber. In the present study, AL and RCL have been finely ground, whereas AS and RCS have been coarsely crushed during the extrusion and pelleting process. The larger particle size might have had positive effects on the gastrointestinal development of broilers fed diets containing AS and RCS and thus on the digestibility of CP and AA from the silages. However, this presumption cannot be proved because organ samples have not been taken in the study.

In linear regression approaches, feed-specific endogenous losses affected by anti-nutritional factors are also considered in the slopes and thus in the pc digestibility estimates (Rodehutsord et al., 2004). Various ANF in alfalfa and red clover were reported. Chang et al. (1978) and Brown et al. (1985) found trypsin inhibitors in AL and a trypsin inhibition activity in red clover has also been described by Maliar et al. (2011). Additionally, RCL contain phenols and polyphenol oxidase (Jones et al., 1995), which is responsible for a low protein degradation in RCS and red clover extracts possibly caused by the formation of protein-phenol complexes (Winters et al., 2008). However, trypsin inhibition and polyphenol oxidase activity have not been investigated in the present study. Therefore, possible effects on the pc CP and AA digestibility cannot be excluded.

Forage legumes contain saponins (Cheeke, 1983), which are considered as the main anti-nutritional substances in alfalfa (Sen et al., 1998). In earlier studies, particularly alfalfa saponins and to a lesser extent clover saponins have been of concern (Cheeke, 1996). Due to this, only the test feedstuffs AL and AS were analyzed for their specific saponin content. However, saponins can also be found in red clover (Oleszek and Jurzysta, 1986; Oleszek and Stochmal, 2002). Besides their throat-irritating effect and bitter taste (Oleszek et al., 1992), saponins influence digestion and absorption of nutrients. As reviewed by Francis et al. (2002), saponins reduce protein digestibility. Soybean saponins have been shown

to affect the proteolytic activity of chymotrypsin and trypsin (Ishaaya and Birk, 1965). Furthermore, saponins can form complexes with proteins (Potter et al., 1993). It was shown that the *in vitro* digestibility of a complex between bovine serum albumin and soyasaponin was lower than that of free bovine serum albumin (Ikeda et al., 1996). As reported by Johnson et al. (1986), some saponins can reduce transmural potential difference, increase the permeability of intestinal mucosal cells and thereby inhibit active nutrient transport. Based on these findings, it is hypothesized that saponins in the tested feedstuffs have adversely affected the pc CP and AA digestibility.

Saponins consist of one, two or three sugar side chains linked to a hydrophobic aglycone (mono-, bis- or tridesmosidic form) (Oleszek, 1996; Francis et al., 2002), resulting in a multitude of different saponins. Alfalfa saponins occur as triterpene glycosides of different aglycones like medicagenic acid, zanhic acid, soyasapogenol and hederagenin (Oleszek, 1996). Depending on their chemical structure of aglycone and sugar side chains, saponins reveal different biological activity. In a study on the intestinal membrane depolarizing activity of alfalfa saponins, zanhic acid glycosides showed a greater reduction of transmural potential difference than medicagenic acid glycosides in the small intestines of rats. The highest depolarizing activity was found in zanhic acid tridesmoside (Oleszek et al., 1994). In the present study, high amounts of a zanhic acid derived compound were found in the tested AL (Table 5), whereas AS contained low amounts of this compound. Conversely, AS showed higher contents of some medicagenic acid glycosides than AL. The concentration of saponins in leaves is higher than in stems (Livingston et al., 1977; Sen et al., 1998). Furthermore, Szumacher-Strabel et al. (2019) have demonstrated structural and quantitative changes of saponins during the ensiling process in ten alfalfa varieties. Three of five detected zanhic acid glycosides degraded substantially, including a decrease in zanhic acid tridesmoside level. In the present study, AL and AS were not gained in the same harvest. Nevertheless, the ensiling might have led to quantitative and structural changes in individual saponins of AS. Regarding the lower pc digestibility values in AL than in AS, especially the higher contents of zanhic acid glycosides in AL rather than medicagenic acid glycosides might have affected the pc digestibility. It might be possible that the pc CP and AA digestibility of RCL and RCS was also affected by saponins, if similar saponin contents and changes occurred in these feedstuffs. However, these presumptions need to be demonstrated. The different biological activity of individual saponins reported in literature as well as our own findings demonstrate that the total saponin concentration is not sufficient to fully

characterize the quality of alfalfa products as feedstuffs. Therefore, the analysis of individual saponins is highly recommended. Saponin concentrations are influenced by several factors like variety, growing season, year of growth and climate factors (Tava et al., 1999; Pecetti et al., 2006). Thus, variation in saponin concentrations of alfalfa and red clover products from different harvests may result in varying pc CP and AA digestibility values in broilers.

Besides that, another factor might have been responsible for the lower digestibility of AL and RCL. Protein solubility is an indicator of overprocessing (Araba and Dale, 1990). The low protein solubility of AL (0.40) and especially of RCL (0.16) therefore indicates a damage to proteins due to the strong heat treatment (100-600°C) during the drying process. In contrast, proteins of the silages AS (0.56) and RCS (0.38) were more soluble. This might have contributed to the higher pc CP and AA digestibility of these feedstuffs. Contrary to that are the results from Pleger et al. (2020). The same lot of AL was compared to AL dried at low temperatures (ALLT; 45°C) in a feeding trial with broilers. The ALLT showed a higher protein solubility (0.54) but no significant differences in the fattening and slaughtering performance of broilers.

Conclusions

Lower precaecal digestibility values of crude protein and amino acids were determined for alfalfa leaves and red clover leaves than for alfalfa silage and red clover silage, possibly due to higher concentrations of various anti-nutritional factors. The valuable crude protein and amino acid concentrations of alfalfa and red clover leaves could not be utilized in their full potential. It is likely that especially the occurrence of saponins have adversely affected the digestibility of the leaf products. Differences in saponin contents suggest that certain individual saponins, e.g. zanhic acid glycosides, might have a more negative effect on crude protein and amino acid digestibility than other saponins. For the establishment of alfalfa and red clover products as reliable protein sources in organic poultry nutrition, further investigations regarding processing methods (harvest, gentle drying, ensiling) and anti-nutritional factors such as phenols and polyphenol oxidase in red clover, trypsin inhibitors or saponins and their biological activity in the gastrointestinal tract are required.

Declarations of interest: none

Acknowledgements

The authors thank the technical staff of the involved laboratories for their excellent assistance.

Funding

This study was supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL, Bonn, Germany) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE, Bonn, Germany; grant number 2815OE039).

References

- Araba, M., Dale, N.M., 1990. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poult. Sci.* 69, 76-83.
<https://doi.org/10.3382/ps.0690076>
- Bayat, A.R., Rinne, M., Kuoppala, K., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., 2010. Ruminant large and small particle kinetics in dairy cows fed red clover and grass silages harvested at two stages of growth. *Anim. Feed Sci. Technol.* 155, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.10.005>
- Brown, W.E., Takio, K., Titani, K., Ryan, C.A., 1985. Wound-induced trypsin inhibitor in alfalfa leaves: Identity as a member of the Bowman-Birk inhibitor family. *Biochemistry* 24, 2105-2108. <https://doi.org/10.1021/bi00330a002>
- Chang, H.-Y., Reeck, G.R., Mitchell, H.L., 1978. Alfalfa trypsin inhibitor. *J. Agric. Food Chem.* 26, 1463-1464.
- Cheeke, P.R., 1983. Biological properties and nutritional significance of legume saponins, in: Telek, L., Graham H. D. (Eds.), *Leaf Protein Concentrates*. Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, USA, pp. 396-414.
- Cheeke, P.R., 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production, in: Waller, G. R. & Yamasaki, K. (Eds.), *Saponins used in food and agriculture*. Plenum Press, New York, USA, pp. 377-386.
- Cohen, S.A., Michaud, D.P., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6- aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 211, 279-287.
<https://doi.org/10.1006/abio.1993.1270>
- European Union, 2007. Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91, in: *Official Journal of the European Union*, L 189. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R0834&from=EN>
- European Union, 2008. Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control, in: *Official Journal of the European Union*, L 250. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0889&from=EN>

- European Union, 2009. Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed (Text with EEA relevance), in: Official Journal of the European Union, L 54. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0152&from=EN>
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88, 587-605. <https://doi.org/10.1079/BJN2002725>
- Ganzer, C., Siegert, W., Kluth, H., Bennewitz, J., Rodehutschord, M., 2017. Prececal amino acid digestibility of soybean cake in fast- and slow-growing broiler chickens. *Poult. Sci.* 96, 2804–2810. <https://doi.org/10.3382/ps/pex090>
- GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie [Society of Nutrition Physiology] 1999. Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler) [Communications of the Committee on Nutrient Requirement Standards. Recommendations for the energy and nutrient supply of laying hens and broilers], DLG-Verlag, Frankfurt a. M., Germany.
- Hoischen-Taubner, S., Sundrum, A., 2016. Ermittlung des Futterwertes und der Verdaulichkeiten der Blattmassen von Luzerne und Perserklee. [Determining the feeding value and digestibility of the leaf mass of alfalfa (*Medicago sativa*) and various types of clover.]. Schlussbericht BÖLN-Projekt FKZ 11OE055, Witzenhausen, Germany. <http://orgprints.org/30426/>
- Ikeda, S., Shimoyamada, M., Watanabe, K., 1996. Interaction between bovine serum albumin and saponin as studied by heat stability and protease digestion. *J. Agric. Food Chem.* 44, 792-795. <https://doi.org/10.1021/jf940742>
- Ishaaya, I., Birk, Y., 1965. Soybean saponins. IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes. *J. Food Sci.* 30, 118-120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1965.tb00273.x>
- Johnson, I.T., Gee, J.M., Price, K., Curl, C., Fenwick, G.R., 1986. Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *J. Nutr.* 116, 2270-2277. <https://doi.org/10.1093/jn/116.11.2270>
- Jones, B.A., Hatfield, R.D., Muck, R.E., 1995. Screening legume forages for soluble phenols, polyphenol oxidase and extract browning. *J. Sci. Food Agric.* 67, 109-112. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670117>

- Kluth, H., Mantei, M., Elwert, C., Rodehutscord, M., 2005a. Variation in precaecal amino acid and energy digestibility between pea (*Pisum sativum*) cultivars determined using a linear regression approach. *Br. Poult. Sci.* 46, 325–332. <https://doi.org/10.1080/00071660500127415>
- Kluth, H., Mehlhorn, K., Rodehutscord, M., 2005b. Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. *Arch. Anim. Nutr.* 59, 271–279. <https://doi.org/10.1080/17450390500217058>
- Livingston, A.L., Whitehand, L.C., Kohler, G.O., 1977. Microbiological assay for saponin in alfalfa products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60, 957–960.
- Maliar, T., Drobná, J., Kraic, J., Maliarová, M., Jurovátá, J., 2011. Proteinase inhibition and antioxidant activity of selected forage crops. *Biologia* 66, 96–103. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0149-9>
- Mateos, G.G., Jiménez-Moreno, E., Serrano, M.P., Lázaro, R.P., 2012. Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. *J. Appl. Poult. Res.* 21, 156–174. <https://doi.org/10.3382/japr.2011-00477>
- Oleszek, W., 1996. Alfalfa saponins: Structure, biological activity, and chemotaxonomy, in: Waller, G. R., Yamasaki, K. (Eds.), *Saponins used in food and agriculture*. Plenum Press, New York, USA, pp. 155–170.
- Oleszek, W., Jurzysta, M., 1986. Isolation, chemical characterization and biological activity of red clover (*Trifolium pratense* L.) root saponins. *Acta Soc. Bot. Pol.* 55, 247–252. <https://doi.org/10.5586/asbp.1986.025>
- Oleszek, W., Stochmal, A., 2002. Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 61, 165–170. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00230-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00230-3)
- Oleszek, W., Jurzysta, M., Ploszynski, M., Colquhoun, I.J., Price, K.R., Fenwick, G.R., 1992. Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 40, 191–196. <https://doi.org/10.1021/jf00014a005>
- Oleszek, W., Nowacka, J., Gee, J.M., Wortley, G.M., Johnson, I.T., 1994. Effects of some purified alfalfa (*Medicago sativa*) saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *J. Sci. Food Agric.* 65, 35–39. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650107>
- Pecetti, L., Tava, A., Romani, M., De Benedetto, M.G., Corsi, P., 2006. Variety and

- environment effects on the dynamics of saponins in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Eur. J. Agron.* 25, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.04.013>
- Pleger, L., Weindl, P.N., Weindl, P.A., Carrasco, L.S., Leitao, C., Zhao, M., Schade, B., Aulrich, K., Bellof, G., 2020. Effects of increasing alfalfa (*Medicago sativa*) leaf levels on the fattening and slaughtering performance of organic broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 104, 1317–1332. <https://doi.org/10.1111/jpn.13353>
- Potter, S.M., Jimenez-Flores, R., Pollack, J., Lone, T.A., Berber-Jimenez, M.D., 1993. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1287–1291. <https://doi.org/10.1021/jf00032a023>
- Presto Åkerfeldt, M., Nihlstrand, J., Neil, M., Lundeheim, N., Andersson, H.K., Wallenbeck, A., 2019. Chicory and red clover silage in diets to finishing pigs— influence on performance, time budgets and social interactions. *Org. Agr.* 9, 127–138. <https://doi.org/10.1007/s13165-018-0216-z>
- Ritteser, C., Grashorn, M., 2015. Bestimmung präcecaler Verdaulichkeitskoeffizienten für heimische Energiefuttermittel für die Hühnermast. [Estimation of ileal nutrient digestibility of native energy and protein feeding stuffs for organic broilers.]. Schlussbericht BÖLN-Projekt FKZ 11OE070, Stuttgart, Germany. <http://www.orgprints.org/29363/>
- Rodehutscord, M., Kapocius, M., Timmler, R., Dieckmann, A., 2004. Linear regression approach to study amino acid digestibility in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 45, 85–92. <https://doi.org/10.1080/00071660410001668905>
- Sauvant D., Perez J.-M., Tran G., 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials, second ed. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands & INRA, Paris, France. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-668-7>
- Sen, S., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1998. Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 46, 131–140. <https://doi.org/10.1021/jf970389j>
- SPSS, 2017. SPSS Version 24.0 for Windows. IBM, New York, USA.
- Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., Cieslak, A., Kozłowska, M., Kuznicki, D., Kowalczyk, M., Oleszek, W., 2019. Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage. *J. Sci. Food Agric.* 99, 2243–2250. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9419>
- Tautenhahn, R., Böttcher, C., Neumann, S., 2008. Highly sensitive feature

- detection for high resolution LC/MS. BMC Bioinformatics 9, 504.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-504>
- Tava, A., Odoardi, M., Oleszek, W., 1999. Seasonal changes of saponin content in five alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars. Agr. Med. 129, 111–116.
- Winters, A.L., Minchin, F.R., Michaelson-Yeates, T.P.T., Lee, M.R.F., Morris, P., 2008. Latent and active polyphenol oxidase (PPO) in red clover (*Trifolium pratense*) and use of a low PPO mutant to study the role of PPO in proteolysis reduction. J. Agric. Food Chem. 56, 2817–2824.
<https://doi.org/10.1021/jf0726177>
- Witten, S., Böhm, H., Aulrich, K., 2019. Effect of variety and environment on the contents of crude nutrients and amino acids in organically produced cereal and legume grains. Org. Agr. 10, 199–219. <https://doi.org/10.1007/s13165-019-00261-7>
- WPSA, 1984. Working Group No. 2 Nutrition: The prediction of apparent metabolizable energy values for poultry in compound feeds. World's Poult. Sci. J. 40, 181-182.
- WPSA, 1989. European table of energy values for poultry feedstuffs, third ed. Subcommittee Energy of the Working Group No. 2 Nutrition of the European Federation of Branches of the World's Poultry Science Association, Beekbergen, Netherlands.
- Wüstholtz, J., Carrasco, S., Berger, U., Sundrum, A., Bellof, G., 2016. Silage from alfalfa (*Medicago sativa*) harvested at an early stage as home-grown protein feed for organic broilers. Europ. Poult. Sci. 80, 1-15.
<https://doi.org/10.1399/eps.2016.150>

Table 1: Analyzed nutritional composition (g/kg dry matter-DM) in the test feedstuffs alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS).

Item	AL	RCL	AS	RCS
Dry matter (g/kg, as fed)	901	887	378	475
Crude ash	111	101	111	139
Crude protein	219	262	240	190
Crude fat	43.8	39.7	30.5	23.4
Crude fiber	174	125	273	182
Starch	68.3	66.6	11.5	39.8
Sugar	69.8	48.9	0.0	92.7
Lysine	13.1	14.2	11.7	9.8
Methionine	3.64	4.25	3.65	2.83
Cystine	2.85	2.21	2.12	1.56
Threonine	9.69	12.1	10.5	8.68
Tryptophan	3.31	3.83	2.62	2.38
Leucine	15.8	21.2	16.7	14.9
Isoleucine	8.66	10.9	10.1	8.11
Valine	11.0	14.3	12.7	10.6
Arginine	9.89	13.2	5.69	8.31
Histidine	5.13	5.46	4.62	4.00
Phenylalanine	10.3	13.8	10.9	9.67
Tyrosine	6.82	9.24	4.54	6.20
Alanine	12.1	15.3	12.8	10.7
Glycine	10.4	13.0	10.4	9.16
Serine	9.07	10.8	9.67	8.29
Proline	11.4	16.4	12.8	13.3
Aspartic acid	27.7	27.9	28.7	21.8
Glutamic acid	22.1	27.9	16.5	17.0
Calcium	29.1	13.1	17.1	14.7
Phosphorus	2.60	3.20	2.77	3.04
Sodium	0.11	0.06	0.12	0.07
Magnesium	2.30	3.70	3.21	2.81
Potassium	22.9	31.1	29.9	40.5
AME _N (MJ/kg DM) ¹	6.33	6.90	5.66	5.70
Coefficient of protein solubility	0.40	0.16	0.56	0.38

¹AME_N: Apparent metabolizable N-corrected energy, calculated according to WPSA (1989)

Table 2: Ingredients (g/kg as fed basis) and analyzed nutritional composition (g/kg dry matter-DM) of the diets with the test feedstuffs alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) at a level of 150 g/kg in phase 2 (P2).

Ingredients	Feeding group				
	P2_C ¹	P2_AL	P2_RCL	P2_AS	P2_RCS
AL/RCL/AS ² /RCS ^{2*}	-	150	150	150	150
Soybean cake*	120	60	70	75	80
Sunflower cake, dehulled*	155	170	160	160	180
Peas*	110	100	100	100	100
Maize*	310	270	275	271	280
Wheat*	271	173	168	160	121
Rapeseed oil*	-	47	45	54	57
Premix ³	25	25	25	25	25
Calcium carbonate	7	1	3	1	3
Monocalcium phosphate	-	2	2	2	2
Sodium chloride	2	2	2	2	2
Analyzed nutritional composition					
Dry matter (g/kg, as fed)	875	891	890	746	792
Crude ash	65.5	73.3	74.1	71.3	84.3
Crude protein	220	228	221	214	205
Crude fat	59.9	112	104	112	108
Crude fiber	48.3	83.4	70.3	115	100
AME _N (MJ/kg DM) ⁴	14.0	13.7	13.7	13.4	13.0
Lysine	10.2	10.6	10.5	10.2	9.28
Methionine	3.59	4.10	3.59	3.46	3.28
Lysine/AME _N (g/MJ)	0.73	0.78	0.77	0.76	0.71
Methionine/AME _N (g/MJ)	0.26	0.30	0.26	0.26	0.25
Coefficient of protein solubility	0.85	0.80	0.74	0.83	0.81

*organically produced

¹P2_C: Control group in P2

²Silage calculation basis: 880 g/kg DM

³Mineral and vitamin supplement per kilogram of diet was as follows: Ca 3.1 g, P 0.50 g, Na 0.75 g, Mg 0.50 g, Cl 0.88 g, Cu 5.0 mg, Zn 33 mg, Mn 53 mg, J 0.38 mg, Se 0.20 mg, vitamin A 2500 IU, vitamin D3 500 IU, vitamin E 25 mg, vitamin K 1.0 mg, vitamin B1 3.0 mg, vitamin B2 3.8 mg, vitamin B6 3.0 mg, vitamin B12 10 µg, niacinamide 40 mg, pantothenic acid 8.8 mg, folic acid 0.88 mg, biotin 175 µg, choline chloride 1250 mg.

⁴AME_N: Apparent metabolizable N-corrected energy, calculated according to WPSA (1984)

Table 3: Ingredients (g/kg as fed basis) of the diets with the test feedstuffs alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) at three inclusion levels in phase 3.

Ingredients	Feeding group		
	AL1/RCL1/ AS1/RCS1	AL2/RCL2/ AS2/RCS2	AL3/RCL3/ AS3/RCS3
AL/RCL/AS ¹ /RCS ^{1*}	100	150	200
Maize starch	100	50.0	0.0
Soybean cake*		90.0	
Sunflower cake, dehulled*		88.0	
Peas*		100	
Maize*		300	
Wheat*		139	
Rapeseed oil*		40.0	
Premix ²		25.0	
Calcium carbonate		4.0	
Monocalcium phosphate		2.0	
Sodium chloride		2.0	
TiO ₂		5.0	
L-Lysine HCl ³		2.0	
DL-Methionine ⁴		1.0	
L-Threonine ⁵		1.0	
L-Tryptophan ⁶		1.0	

*organically produced

¹Silage calculation basis: 880 g/kg DM

²Mineral and vitamin supplement per kilogram of diet was as follows: Ca 3.1 g, P 0.50 g, Na 0.75 g, Mg 0.50 g, Cl 0.88 g, Cu 5.0 mg, Zn 33 mg, Mn 53 mg, J 0.38 mg, Se 0.20 mg, vitamin A 2500 IU, vitamin D3 500 IU, vitamin E 25 mg, vitamin K 1.0 mg, vitamin B1 3.0 mg, vitamin B2 3.8 mg, vitamin B6 3.0 mg, vitamin B12 10 µg, niacinamide 40 mg, pantothenic acid 8.8 mg, folic acid 0.88 mg, biotin 175 µg, choline chloride 1250 mg.

³L-Lysine HCl, BESTAMINO, CJ CheilJedang Corp., Korea: Lysine content 790 mg/g (Minimum), DM 990 mg/g, CP 946 mg/g, purity 990 mg/g

⁴MetAMINO, Evonik Nutrition & Care GmbH, Germany: Methionine content 990 mg/g, CP 581 mg/g, ash 5 mg/g

⁵ThreAMINO, Evonik Nutrition & Care GmbH, Germany: Threonine content 985 mg/g, CP 724 mg/g, ash 5 mg/g

⁶L-Tryptophan, Ajinomoto Animal Nutrition Europe, France: Tryptophan content 980 mg/g, DM 990 mg/g, CP 840 mg/g

Table 4: Analyzed nutritional composition (g/kg dry matter-DM) of the diets with the test feedstuffs alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) at three inclusion levels (100/150/200 g/kg) in phase 3.

Item	AL1 100	AL2 150	AL3 200	RCL1 100	RCL2 150	RCL3 200	AS1 100	AS2 150	AS3 200	RCS1 100	RCS2 150	RCS3 200
Dry matter (g/kg, as fed)	889	884	886	885	886	883	820	780	747	838	808	782
Crude ash	68.6	74.9	78.2	69.3	73.6	78.6	70.0	73.4	78.8	77.2	81.7	86.9
Crude protein	172	190	199	182	192	206	179	196	204	177	180	190
Crude fat	86.3	92.5	95.9	94.8	90.8	92.7	89.7	92.3	93.9	87.7	85.9	89.5
Crude fiber	50.9	60.4	66.6	49.4	58.2	63.2	62.9	82.4	99.7	60.4	66.7	83.5
AME _N (MJ/kg DM) ¹	14.3	13.8	13.4	14.4	13.8	13.3	14.2	13.6	13.1	14.0	13.4	12.8
Lysine	10.2	11.5	11.8	11.1	11.2	11.8	11.0	11.1	11.7	10.4	10.6	10.8
Methionine	3.85	4.21	4.42	4.13	4.37	4.26	4.20	4.21	4.46	4.17	3.86	4.19
Cystine	3.06	3.25	3.34	3.03	3.18	3.18	3.11	3.16	3.22	3.06	2.93	2.99
Threonine	7.79	8.82	8.99	8.48	8.66	8.99	8.40	8.51	9.28	7.90	8.24	8.54
Tryptophan	2.75	3.01	3.22	2.97	3.02	3.10	3.17	3.12	3.16	3.01	2.97	2.93
Leucine	13.8	15.0	15.5	14.7	15.1	16.0	14.5	14.8	15.9	13.9	14.6	14.7
Isoleucine	7.00	7.62	8.03	7.69	7.68	8.28	7.62	7.83	8.35	7.14	7.59	7.60
Valine	8.40	9.12	9.60	9.09	9.16	10.1	9.04	9.27	9.96	8.46	9.16	9.13
Arginine	12.0	13.0	13.2	13.0	12.9	13.2	12.6	12.1	12.6	12.1	12.4	12.4
Histidine	5.12	5.79	5.73	5.46	5.63	5.85	5.45	5.31	5.60	5.11	5.34	5.33
Phenylalanine	8.74	9.50	9.84	9.47	9.69	10.29	9.20	9.46	10.11	8.82	9.31	9.37
Tyrosine	5.65	6.28	6.42	6.01	6.23	6.65	5.61	5.65	5.99	5.63	5.91	5.97
Alanine	8.66	9.64	9.92	9.20	9.77	10.51	9.17	9.46	10.3	8.77	9.32	9.72
Glycine	8.28	9.43	9.43	8.88	9.25	9.63	8.96	8.90	9.61	8.41	8.91	9.13
Serine	8.16	9.70	9.05	8.70	9.31	9.39	8.87	8.55	9.76	8.41	8.99	9.12
Proline	10.4	10.9	11.1	10.3	10.5	10.7	10.4	10.9	11.6	10.7	11.0	11.2
Aspartic acid	17.6	19.8	20.8	18.5	19.2	20.1	19.1	20.0	21.3	18.0	18.6	19.7
Glutamic acid	33.1	33.7	34.1	33.8	33.5	34.0	33.6	33.3	34.2	32.2	32.2	32.4
Coefficient of protein solubility	0.78	0.75	0.71	0.74	0.71	0.67	0.78	0.77	0.75	0.81	0.79	0.71

¹AME_N: Apparent metabolizable N-corrected energy, calculated according to WPSA (1984)

Table 5: Relative contents of nine major putatively identified saponins expressed as equivalent umbelliferone ($\mu\text{g/g}$ dry matter-DM) in alfalfa leaves (AL) and alfalfa silage (AS).

Saponins*	Aglycone	Retention time (min)	Accurate mass measured	Mass error (ppm)	Saponin contents, umbelliferone equivalent ($\mu\text{g/g}$ DM) (n=3) (SEM ¹)	
					AL	AS
Hex-Hederagenin	Hederagenin	21.93	633.39	16.19	11.3 (2.1)	65.5 (3.2)
3-Glc-medicagenic acid	Medicagenic acid	16.75	663.37	16.45	44.6 (4.9)	37.3 (1.3)
Medicagenic acid derived	Medicagenic acid	12.98	1104.53	4.88	51.4 (11.8)	62.6 (2.0)
Hex-HexA-Aglycone A	Unknown	16.45	823.40	14.25	61.4 (16.4)	23.4 (0.3)
Azukisaponin II	Azukisaponin	19.79	795.44	13.20	62.7 (12.9)	111 (3.2)
Medicoside H	Medicagenic acid	14.19	941.46	13.00	84.2 (9.7)	209 (5.4)
Medicagenic acid 3-O- β -D-glucuronide	Medicagenic acid	19.47	677.35	11.44	89.3 (21.8)	242 (4.0)
3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagenic acid	Medicagenic acid	12.97	1103.52	4.80	101 (18.8)	138 (13.2)
HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-Zanhic acid	Zanhic acid	13.98	1235.55	5.56	200 (34.5)	12.4 (0.5)

*Saponin abbreviations: Ara: arabinose; Glc: glucose; Hex: hexose; HexA: hexuronic acid; dHex: 6-deoxyhexose; Pen: pentose; Rha: rhamnose.

¹SEM: Standard error of the mean of saponin concentration measured for three replicates

Table 6: Growth performance of broilers fed diets containing 150 g/kg of the test feedstuffs alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) in phase 2 (P2).

Item		Feeding group					P-value
		P2_C ¹	P2_AL	P2_RCL	P2_AS	P2_RCS	
Daily feed intake (day 22-28)	g DM ² / day	72.5	76.7	81.7	73.8	79.2	0.574
SEM		5.03	4.11	4.11	4.11	4.11	
Body weight (day 21)	g	406	401	410	403	406	0.632
SEM		5.31	4.34	4.34	4.34	4.34	
Body weight (day 28)	g	677 ^b	649 ^c	672 ^{bc}	704 ^a	653 ^{bc}	<0.001
SEM		8.39	6.85	6.85	6.85	6.85	
Daily weight gain (day 22-28)	g/day	38.8 ^b	35.3 ^b	37.4 ^b	43.0 ^a	35.2 ^b	<0.001
SEM		1.36	1.11	1.11	1.11	1.11	
Feed conversion rate (day 22-28)	kg/kg	1.87 ^{ab}	2.20 ^a	2.19 ^a	1.72 ^b	2.26 ^a	0.029
SEM		0.16	0.13	0.13	0.13	0.13	

¹P2_C: Control group in P2

²DM: Dry matter

^{a-c} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments (P≤0.05).

Table 7: Growth performance of broilers fed diets containing three different inclusion levels of the test feedstuffs alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) in phase 3.

Item		Feeding group											SEM	P-value	
		AL1	AL2	AL3	RCL1	RCL2	RCL3	AS1	AS2	AS3	RCS1	RCS2			RCS3
Inclusion level (g/kg)		100	150	200	100	150	200	100	150	200	100	150	200		
Daily feed intake (day 29-41/42)	g DM ¹ /day	113	121	124	122	133	115	116	120	112	111	110	104	7.58	0.423
Daily feed intake (day 30-41/42)	g DM/day	119	132	133	131	144	123	120	128	117	114	115	107	8.48	0.178
Body weight (day 28)	g	650 ^{bc}	652 ^{bc}	644 ^{bc}	665 ^{bc}	682 ^{bc}	668 ^{bc}	738 ^a	679 ^{bc}	693 ^b	654 ^{bc}	632 ^c	672 ^{bc}	10.9	<0.001
Body weight (day 41/42)	g	1399 ^c	1418 ^{bc}	1341 ^c	1386 ^c	1372 ^c	1384 ^c	1615 ^a	1544 ^{ab}	1555 ^a	1375 ^c	1297 ^c	1304 ^c	32.5	<0.001
Daily weight gain (day 29-41/42)	g/day	55.5 ^{bc}	56.8 ^b	51.5 ^{bcd}	53.2 ^{bcd}	51.1 ^{bcd}	53.0 ^{bcd}	64.9 ^a	64.0 ^a	63.8 ^a	53.5 ^{bcd}	49.2 ^{cd}	47.0 ^d	1.53	<0.001

¹DM: Dry matter

^{a-d} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments ($P \leq 0.05$).

Table 8: Coefficients of precaecal digestibility (pcd) of crude protein and amino acids in organically produced alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) determined with a linear regression approach in 41/42-day-old broilers.

Item	AL			RCL			AS			RCS		
	pcd	SEM	r ²	pcd	SEM	r ²	pcd	SEM	r ²	pcd	SEM	r ²
Crude protein	0.51	0.108	0.69	0.50	0.115	0.65	0.88	0.111	0.86	0.70	0.195	0.56
Lysine	0.49	0.097	0.72	0.61	0.124	0.70	1.00	0.300	0.53	0.88	0.134	0.81
Methionine	0.61	0.097	0.80	0.73	0.100	0.84	0.84	0.144	0.77	0.99	0.133	0.85
Cystine	0.21	0.159	0.15	0.27	0.143	0.27	0.53	0.276	0.27	0.85	0.313	0.43
Threonine	0.40	0.106	0.59	0.48	0.144	0.53	0.78	0.154	0.72	0.65	0.183	0.56
Tryptophan	0.46	0.102	0.67	0.52	0.145	0.57	0.77	0.131	0.78	0.97	0.178	0.75
Leucine	0.45	0.118	0.60	0.50	0.127	0.61	0.81	0.097	0.87	0.79	0.132	0.78
Isoleucine	0.45	0.127	0.55	0.53	0.178	0.47	0.80	0.113	0.84	0.77	0.129	0.78
Valine	0.40	0.132	0.48	0.12	0.217	0.03	0.77	0.127	0.79	0.74	0.130	0.76
Arginine	0.62	0.082	0.85	0.78	0.086	0.89	0.79	0.100	0.86	0.90	0.090	0.91
Histidine	0.50	0.082	0.79	0.53	0.109	0.71	0.57	0.120	0.70	0.82	0.126	0.81
Phenylalanine	0.49	0.114	0.65	0.62	0.129	0.69	0.80	0.121	0.81	0.79	0.130	0.79
Tyrosine	0.44	0.113	0.61	0.52	0.122	0.65	0.72	0.136	0.74	0.77	0.149	0.73
Alanine	0.37	0.124	0.48	0.43	0.141	0.48	0.80	0.125	0.81	0.70	0.145	0.70
Glycine	0.30	0.105	0.46	0.36	0.147	0.38	0.61	0.145	0.64	0.63	0.179	0.56
Serine	0.32	0.089	0.56	0.48	0.122	0.61	0.74	0.181	0.62	0.66	0.177	0.58
Proline	0.40	0.102	0.61	0.52	0.138	0.58	0.77	0.091	0.88	0.72	0.156	0.68
Aspartic acid	0.49	0.102	0.70	0.52	0.115	0.67	0.81	0.097	0.87	0.74	0.134	0.75
Glutamic acid	0.52	0.112	0.69	0.69	0.110	0.80	0.80	0.089	0.89	0.92	0.115	0.87

3.2 Leistungsversuch: Effekte steigender Anteile an Luzerneblättern (*Medicago sativa*) auf die Mast- und Schlachtleistung ökologischer Masthühner

Das folgende Manuskript „Effects of increasing alfalfa (*Medicago sativa*) leaf levels on the fattening and slaughtering performance of organic broilers“ wurde am 10. September 2019 im „Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition“ eingereicht und am 21. Februar 2020 von der Schriftleitung zur Veröffentlichung angenommen.

The following manuscript entitled “Effects of increasing alfalfa (*Medicago sativa*) leaf levels on the fattening and slaughtering performance of organic broilers” has been submitted in the “Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition” on September 10th, 2019 and has been accepted for publication on February 21st, 2020.

This article is published in:

Journal: Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition

Volume: 104, Issue 5, Pages 1317-1332

Authors: Lydia Pleger, Petra Nicole Weindl, Peter Andreas Weindl, Luz Salomé Carrasco, Céline Leitao, Minjie Zhao, Benjamin Schade, Karen Aulrich, Gerhard Bellof

Title of article: Effects of increasing alfalfa (*Medicago sativa*) leaf levels on the fattening and slaughtering performance of organic broilers

<https://doi.org/10.1111/jpn.13353>

© 2020 Blackwell Verlag GmbH

Effects of increasing alfalfa (*Medicago sativa*) leaf levels on the fattening and slaughtering performance of organic broilers**Saponins in alfalfa leaves affect broiler performance**

Lydia Pleger¹, Petra Nicole Weindl¹, Peter Andreas Weindl¹, Luz Salomé Carrasco¹, Céline Leitao², Minjie Zhao³, Benjamin Schade⁴, Karen Aulrich⁵, Gerhard Bellof¹

¹University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf, Faculty of Sustainable Agriculture and Energy Systems, Am Staudengarten 1, 85354 Freising, Germany

²Twistaroma, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch, France

³University of Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France

⁴Bavarian Animal Health Services, Department of Pathology, Senator-Gerauer-Str. 23, 85586 Poing - Grub, Germany

⁵Johann Heinrich von Thünen-Institute, Institute of Organic Farming, Trenthorst 32, 23847 Westerau, Germany

Abstract

A feeding trial was conducted to evaluate the effects of increasing alfalfa leaf levels on the performance of organic broilers. The impact of drying temperature on the nutritional value of alfalfa leaves and thereby on broiler performance was studied using alfalfa leaves dried at either low (alfalfa leaves low temperature (ALLT)) or high temperatures (alfalfa leaves (AL)). Six hundred male Hubbard JA-757 broilers were divided into five feeding groups (Control (C), AL2, AL3, AL4 and ALLT5). Alfalfa leaf content was increased in each of the three fattening phases by 5% (C: 0%-0%-0%; AL2: 0%-5%-10%; AL3: 5%-10%-15%; AL4: 10%-15%-20%; and ALLT5: 10%-15%-20%). At the end of the experiment, broilers in group C had the highest body and carcass weights. Groups AL3, AL4, and ALLT5 showed the lowest body and carcass weights. In particular, the early introduction of alfalfa leaves (5% in phase 1) and high alfalfa leaf content (15%-20%) significantly decreased performance. Antinutritional substances such as saponins occur in alfalfa. In fact, the saponin analysis showed high contents of 3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-medicagenic acid and HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-zanhic acid in both high and low temperature alfalfa leaves.

Keywords: Alfalfa leaves, broiler, organic fattening, performance, protein feed, saponins

Introduction

The nutrition of monogastric livestock under the terms of a 100% organic diet is still a challenge. EU guidelines require the absence of conventionally produced feedstuffs and the use of mainly locally produced feed components (European Commission, 2008; European Union, 2007). A needs-based protein and amino acid supply, especially for pigs and poultry, under these conditions is still hardly feasible. Therefore, the permission of up to 5% conventionally produced protein feedstuffs, which first counted only until the end of 2017, had to be extended (European Commission, 2018). The main challenge of 100% organic feeding in monogastric animals is the supply with amino acids, particularly with the first-limiting amino acids methionine and lysine. Due to its nitrogen-fixing properties, the forage legume alfalfa is grown in organic crop rotations. It is usually used as mulch or in the feeding of ruminants (Wiens, Entz, Martin, & Hammermeister, 2006). Moreover, the harvested alfalfa could represent a valuable protein and amino acid source for monogastric animals. Harvested at a very early stage, alfalfa whole plant can reach crude protein (XP) contents of up to 300 g/kg of dry matter (DM) (Weltin, Carrasco, Berger, & Bellof, 2014). Referring to the XP content, the methionine and lysine levels (methionine: 1.8 g/100 g XP; lysine: 6.0 g/100 g XP) of such material are comparable to that of soybean cake (methionine: 1.5 g/100 g XP; lysine: 5.9 g/100 g XP; DLG, 2014). Wüstholtz, Carrasco, Berger, Sundrum, & Bellof (2016) already proved the high potential of alfalfa whole plant silage as home-grown organic protein source in poultry nutrition. Compared to the whole plant, alfalfa leaves show on average higher protein contents (283 versus 244 g/kg DM) and amino acid contents (methionine: 2.8 versus 2.2 g/kg DM; lysine: 17.4 versus 13.1 g/kg DM) along with lower crude fibre (XF) contents (125 versus 172 g/kg DM) (Hoischen-Taubner & Sundrum, 2016). Sommer and Sundrum (2015) propose the separation of leaves from stems in forage legumes like alfalfa in this context. Due to the limited capacity to digest fibrous (human-inedible) feeds, monogastric animals consume high proportions of feedstuffs (e.g. soy products) that directly compete with human food (Ertl et al., 2016). The replacement of human-edible feeds by human-inedible feeds greatly contributes to more sustainable livestock systems (Schader et al., 2015). Thus, if dried alfalfa leaves were applicable in considerable amounts in broiler diets, this feedstuff could replace the food-competing soybean cake and contribute to more sustainability in organic monogastric feeding. Moreover, alfalfa is rich in carotenoids and might contribute to a desirable pigmentation of broiler products.

Besides its valuable crude protein and amino acid content, alfalfa also contains

saponins, which are considered as the main antinutritional components in this forage legume (Kalač, Price, & Fenwick, 1996; Sen, Makkar, & Becker, 1998), especially for monogastric animals (Cheeke, 1983). Among others, important effects of saponins are a lowered feed intake, an impaired nutrient absorption, and growth depression (Cheeke, 1983; Cheeke, 1996). Ritteser and Grashorn (2015) also describe a loss of performance after a feed change from a commercial organic starter to diets containing different levels of alfalfa leaves to broilers. Thus, the current study investigated the following questions: Whether and to which levels can alfalfa leaves be successfully used as a protein source in the organic feeding of fattening broilers? Does the gradual increase in alfalfa leaves (5%) have an effect on the performance and health of broilers? Is there any relationship between the performance of broilers and the saponin content in alfalfa? Does the drying temperature of alfalfa leaves (low versus high temperatures) have an influence on the quality of alfalfa leaves and thus the performance of broilers? Does the feeding of alfalfa leaves influence meat or carcass colour?

Materials and methods

Harvest and preparation of alfalfa leaves

The alfalfa variety used in this study was Plato. Leaf material was gained by a prototype leaf harvester (Co. Trust'ing, Nantes, France) in the middle of bloom (4th cut) at the end of September 2017 in Freising (Germany). One lot of the material (alfalfa leaves, AL) was transported to a commercial forage drying company (Futtertrocknung Lamerdingen eG, Lamerdingen, Germany) and dehydrated by hot air (5-8 hr after the end of harvest). Drying temperature ranged between 200 and 600°C at the entrance and 100°C at the end of the drying drum; the drying time was 2-5 min. Three tonnes of alfalfa leaves were dried within 1.5 hr. Another lot (alfalfa leaves low temperature, ALLT) was harvested from the same field 4 days before the harvest of AL. ALLT was dried in open trailers by the waste heat of a biogas plant at approximately 45°C for 36 hr (5-8 hr after the end of harvest). In order to reduce remaining stems, a further separation through destemming, screening, sieving, and trieur cleaning (Co. Völpel GmbH & Co. KG, Königsmoos, Germany) was conducted in both lots after drying. The leaves of both lots were finely ground and stored in a dry room without air condition for 5 months. Then, AL and ALLT were processed with fitting feed components to serve as pelleted single-feed diets in the experiment.

Experimental design and feed mixtures

The experiment followed a randomized design (Table 1) involving five feeding groups with five replicates each (one replicate = one pen). The control group (C) received an alfalfa-free diet (Table 2). Feed mixtures of group AL2, AL3 and AL4 contained alfalfa leaf material dried by hot air, whereas the diets of feeding group ALLT5 included alfalfa leaves dried by low temperature. The experiment was divided into three feeding phases: Phase 1 (P1, starter phase from 1st to 14th day), phase 2 (P2, grower phase from 15th to 28th day) and phase 3 (P3, fattening phase from 29th to 56th day). In terms of a dose-response experiment, the alfalfa leaf content was gradually increased by 5% in each of the three feeding phases (C: 0%-0%-0%; AL2: 0%-5%-10%; AL3: 5%-10%-15%; AL4: 10%-15%-20%; and ALLT5: 10%-15%-20%), whereas soybean cake, sunflower cake and peas were proportionally reduced. High contents of alfalfa leaves of up to 20% were used to evaluate the potential as a replacer of soybean cake in organic broiler diets. The complete feed mixtures were compiled according to eco-standards and GfE (1999) recommendations. All components were 100% organic. Energy contents were lowered in accordance with consistent amino acid-energy ratios (Bellof, Schmidt,

& Ristic, 2005). The aspired apparent metabolizable energy (AME_N) was 12.8 MJ/kg DM (P1), 12.9 MJ/kg DM (P2) and 13.1 MJ/kg DM (P3) respectively. AME_N was calculated according to WPSA (1984).

Broiler management

A total of 600-day-old male broiler chickens of the genotype Hubbard JA-757 were housed in a conventional poultry house without outdoor access and distributed to 25 pens (6 m²/pen; 24 chickens/pen). At the beginning of the experiment, the chickens live weight averaged 38 g over all pens (Table 8). The temperature in the stable was thermostatically controlled and regulated by two heaters. Heat lamps were additionally installed in each pen during the first 14 days. The pens were interspersed with wood shavings. Pellets were offered *ad libitum* in feed dispensers, and the broilers had free access to water. All broilers were vaccinated against Marek's disease, infectious bursal disease (IBD), avian infectious bronchitis (IB) and coccidiosis.

Sampling and analytical methods

Alfalfa leaves AL and ALLT, and feed components as well as the complete feed mixtures (one composite sample each) were analysed at the laboratory of the Thünen-Institute of Organic Farming (Trenthorst, Germany). Subsequently, samples were dried at 40°C and either ground to pass through a 1.0 mm sieve for analyses of crude nutrients or through a 0.5 mm sieve for amino acid and mineral analysis. The analysis of crude nutrients, including starch and sugar, was performed according to Commission Regulation No 152/2009 (European Commission, 2009). Contents of amino acids in the samples were analysed by HPLC according to Commission Regulation No 152/2009 (European Commission, 2009) regarding sample preparation via oxidation and hydrolysis. The subsequent derivatization and chromatography were performed according to Cohen and Michaud (1993). The adapted analytical procedure was recently described in detail by Witten, Böhm, and Aulrich (2019). All samples were additionally analysed for minerals after microwave-assisted digestion and determination via atomic absorption spectroscopy. However, the phosphorus content was determined according to Commission Regulation No 152/2009 (European Commission, 2009) with the photometric method. Protein solubility of the samples was examined according to Araba and Dale (1990). Both alfalfa leaf batches and diets of P3 were additionally analysed for their carotene content according to VDLUFA official

methods (Naumann & Bassler, 2012).

Furthermore, saponins in the alfalfa leaves AL and ALLT (one composite sample each) were analysed by ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) in the laboratory Twistaroma, Illkirch, France. The saponins were extracted, in triplicate, from 200 mg of dried samples in 80% ethanol containing 18 µg/ml of umbelliferone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) used to calculate the relevant content of each saponin. Extraction was performed by ultrasonic shaking (Elmasonic S 30 H, 50-60 Hz, 280 W) for 45 min at room temperature, followed by centrifugation at 8000 × g for 5 min. The supernatant was analysed by a Waters Acquity UPLC (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) coupled to a micrOTOF-Q II mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Germany) using an electrospray interface with Jet Stream technology. Chromatographic separation was achieved on Acquity UPLC BEH Shield RP18 column (2.1x100 mm, 1.7 µm, Waters). The mobile phases, delivered at 0.28 ml/min, consisted of water containing 0.1% formic acid (eluent A) and acetonitrile containing 0.1% formic acid (eluent B). The following gradient program was used: 5%-70%B (0-30 min), 70%B (30-35 min), 70%-95%B (35-36 min) and 95%B (36-43 min). Finally, the column was re-equilibrated as the initial conditions (5%B) for 3 min. The injection volume was 5 µL. The electrospray ionization (ESI) was operated in negative mode. High-purity nitrogen was used as nebulizing gas (pressure 40.6 psi) and as a drying gas (9.0 L/min at 200°C). Needle voltage was set at 4000 V and detector at 2037 V. Spectra were acquired in full scan MS mode with *m/z* range of 100-2000 and an acquisition rate of 2 spectra/s. Transfer and collision cell parameters were as follows: funnel 1 RF 200 Vpp; funnel 2 RF 200 Vpp; quadrupole ion energy: 5.0 eV; collision cell energy: 1.0 eV with collision RF of 120 Vpp, transfer time of 55 µs; and Pre Pulse storage of 1.0 µs. The data station operating software was micrOTOF 3.0. Prior to analysis, the instrument was calibrated using a sodium formate calibration solution. The relevant content of the major saponins was calculated based on the relative peak areas (saponin/umbelliferone) and expressed as equivalent umbelliferone (µg/g DM).

Raw UPLC–HRMS data files (.mzXML) were processed in R statistical language (version 3.5.2, <http://www.r-project.org/>) using the open-free XCMS (Tautenhahn, Böttcher, & Neumann, 2008) and CAMERA R-packages. Saponins were putatively characterized by comparing the recorded exact mass and data from Twistaroma in-house database as well as reference literature (Huhman & Sumner, 2002; Oleszek et al., 1990; Oleszek et al., 1992; Sen et al., 1998).

During the feeding trial, animal losses were monitored daily. Feed consumption

(per pen) and individual body weights were registered after each feeding phase. The average body weights per pen were calculated on the basis of individual body weights. The calculation of feed conversion rate was based on body weights and feed consumption in consideration of animal losses. At the end of phase 3 (day 56) a sample of four broilers of each pen, representing the average weight of the respective pen, were chosen for slaughter according to animal welfare regulations. Slaughtering took place two days after final weighing (day 58). A four-centimeter intestine segment was dissected right after slaughter and immersed in 10% buffered formalin. Following paraffin embedding, 4- μ m-thick sections were cut and stained with haematoxylin and eosin (HE) to evaluate the intestinal health by histological examination. The length of four crypts and four villi was measured and averaged for each broiler. One day after slaughter, carcasses and commercial cuts were weighed. Meat (breast), skin (breast), and abdominal fat colour were measured using a Minolta Chroma Meter (CR 410) in the CIELAB system. The parameters lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*) and colour difference (dE^*ab) were determined 24 hr after slaughter. Those parameters were also measured for the ground alfalfa leaves (AL, ALLT) and all feed mixtures (ground).

Statistical analysis

The collected data were statistically analysed according to the general linear model (GLM). Differences between groups were tested by the post hoc Tukey test. Differences with a level below 0.05 were considered significant. The statistical program used was SPSS 22.0 (2013).

Results

Nutritional composition of alfalfa leaves AL/ALLT

The differing nutritional composition of both alfalfa leaf lots is shown in Table 3. The alfalfa leaf lot dried by hot air (AL) showed a lower protein solubility (40%) compared to ALLT (54%). Carotene content of AL was higher (168 mg/kg DM) than that of ALLT (135 mg/kg DM).

Thirty-four saponin compounds were detected and putatively identified in both alfalfa leaf products (AL and ALLT) via UPLC-HRMS (Table 4). Table 5 presents the relative contents of the eight major putatively identified saponins. Among these, five saponins consist of medicagenic acid, one consists of zanhic acid, one consists of azukisaponin, and one consists of an unknown aglycone. Particularly high contents were measured for 3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-medicagenic acid and HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-zanhic acid in AL (101 and 200 equivalent umbelliferone $\mu\text{g/g}$ DM, respectively) and in ALLT (94.4 and 175 equivalent umbelliferone $\mu\text{g/g}$ DM, respectively). Some saponins were found in higher contents in AL than in ALLT.

Nutritional composition and colour of feed mixtures

Table 6 displays the analysed nutrients of the diets. The aspired energy, amino acid and mineral contents were in compliance with the planned values with only few exceptions (higher AME_N contents in AL2 (P2), AL3 (P2); lower XP content in AL3 (P1)). The methionine/ AME_N relation in all feed mixtures and phases was marginally lower than recommended (GfE, 1999). The valine/ AME_N relation in all feeding groups in phase 1 was in accordance with the recommended values, whereas the valine/ AME_N relation in the diets of phases 2 and 3 was slightly lower than recommended (GfE, 1999). In particular, the feed mixture of AL3 (P2) showed a lower valine/ AME_N relation of 0.64 g/MJ, which amounted to 81% of the recommended value. Nevertheless, the lower methionine/ AME_N and valine/ AME_N relations were on equal levels within the diets of the particular phases, except for the above-mentioned valine/ AME_N relation in AL3 (P2). In general, protein solubility decreased with increasing alfalfa leaf levels. In phases 2 and 3, higher protein solubility values were determined for diet ALLT5 than for diet AL4. Carotene contents of P3 diets (in mg/kg DM; C: <0.5, AL2: 16, AL3: 25, AL4: 31, and ALLT5: 26) differed in accordance with the increasing alfalfa leaf levels and the differences between AL and ALLT.

Due to the lower drying temperature, the colour of alfalfa leaves ALLT was lighter

than AL (ALLT: L* 59.06, AL: L* 52.23). The negative parameter of a*, which indicates green colour, was more pronounced in ALLT than AL (ALLT: a* -7.24, AL: a* -4.24). The increasing levels of alfalfa leaves in the feed mixtures led to a growingly darker and greener colour of the pellets in contrast to the control (e. g. diets of P3; C: L* 72.0, a* 1.04, b* 13.3; AL2: L* 61.7, a* -2.66, b* 19.0; AL3: L* 59.1, a* -2.78, b* 18.5; AL4: L* 54.9, a* -2.50, b* 17.3; ALLT5: L* 57.6, a* -3.20, b* 18.9). In consequence of the lighter colour of ALLT compared to AL, pellets of feeding group ALLT5 were marginally lighter. The control feed showed a typical colour of a grain-based poultry diets.

Animal losses

The number of animal losses was low (2.7% based on the total animal population and all three phases). There were no significant differences between the feeding groups.

Feed consumption

The average feed consumption per animal and day is described in Table 7. Significant differences were detected between the feeding groups in all phases. The control group showed the highest feed consumption throughout the whole experiment. At levels of 10% alfalfa leaves and more (P1: AL4 and ALLT5; P2: AL3, AL4 and ALLT5; and P3: AL2, AL3, AL4 and ALLT5), a significant lower feed consumption was recorded. Regarding the two different batches of alfalfa leaves in the diets of AL4 and ALLT5, no significant differences in feed consumption were observed between these groups except for phase 2. Altogether, the feed consumption in the AL/ALLT groups decreased with increasing levels of alfalfa leaves in the diets.

Growth performance

Daily weight gains decreased as soon as diets contained the first addition level of 5% alfalfa leaves in phase 1 (Table 8). Consequently, feeding groups without any alfalfa leaf content in their diets (C, AL2) had significantly higher body weights compared to the other feeding groups in this phase. The same pattern was shown in phase 2 by group AL2, showing a significant decline in weight gain and a lower body weight compared to the control, when receiving a 5% alfalfa leaf diet for the first time. However, the weight advance of AL2 compared to the experimental

groups AL3, AL4 and ALLT5 was maintained. The highest final body weight (2204 g) was achieved by the control group. Groups AL3, AL4 and ALLT5 showed the lowest body weights at the end of phase 3 (69%, 63% and 67% of the control group). Differences in daily weight gain and final body weight between the feeding groups AL4 and ALLT5 were not significant.

Feed conversion rate

The feed conversion ratios are displayed in Table 9. In general, higher alfalfa levels led to impaired feed conversion ratios. The control group showed the best feed conversion throughout all phases. Although statistically not significant, group ALLT5 (1.92 kg/kg) had a slightly better feed conversion than AL4 (2.09 kg/kg) after phase 2. After phase 3, the feed conversion rate of group ALLT5 was significantly better (2.97 versus 3.27 kg/kg).

Carcass yield and carcass composition

Live weights before slaughter and carcass weights were in accordance with final fattening weights and showed the same deviations between the feeding groups (Table 10). A deprivation in performance with increasing alfalfa leaf levels was also recognizable for the weights (breast, drumstick) and proportions of valuable parts (breast).

Colour of skin, meat and abdominal fat

The intake of alfalfa leaves strongly affected the colour of the products (Table 11). Alfalfa leaf groups showed lower values in redness (a^*) and higher values in yellowness (b^*) and colour difference (dE^*ab) of skin, meat and fat. Yellowness significantly intensified up to an alfalfa leaf level of 15% (AL3) for the meat. Levels of 20% (AL4, ALLT5) did not lead to a significant additional intensification of the yellow colour. There is a close relationship between yellowness of skin and carotene content in the diets (Figure 1a) and the same relationship was observed for meat and fat (Figure 1b, c).

Intestine findings

There were no macroscopically visual indications for gut damage or inflammation. The histological examination showed no significant differences between the feeding groups for crypt and villus length. Few cases of enteritis were found but

incoherent to the increasing alfalfa leaf levels in the diets (granulocytic enteritis: C 0%, AL2 10%, AL3 20%, AL4 5% and ALLT5 10%; non-purulent enteritis: C 20%, AL2 20%, AL3 20%, AL4 5% and ALLT5 20%). Crypt hyperplasia and lymph follicle accumulation were diagnosed more often in AL/ALLT groups (crypt hyperplasia: C 30%, AL2 50%, AL3 65%, AL4 35% and ALLT5 50%; lymph follicle accumulation: C 25%, AL2 50%, AL3 55%, AL4 35% and ALLT5 20%).

Discussion

Due to the late availability of the leaf harvester, the targeted harvest of AL/ALLT in an early stage could not be realized. The XP and XF contents of the alfalfa leaves in the present study (XP: AL 219 versus ALLT 228 g/kg DM; XF: AL 174 versus ALLT 202 g/kg DM) were in accordance with literature (XP: 201-339 g/kg DM; XF: 112-202 g/kg DM; Hoischen-Taubner & Sundrum, 2016; Jentsch, Schiemann, & Wiesemüller, 1991; Ritteser & Grashorn, 2015). Hence, the harvested alfalfa leaves had a desirable quality but showed rather low XP and high XF contents within the possible ranges. Crude protein contents in alfalfa decrease with advancing maturity stages. Conversely, fibre contents (neutral detergent fibre, acid detergent fibre and acid detergent lignin) increase (Balde, Vandersall, Erdman, Reeves, & Glenn, 1993), which results in decreased nutrient digestibility. In the present study, higher XP and lower XF contents of alfalfa leaves could have been realized by harvesting in an earlier stage as it was shown by Hoischen-Taubner & Sundrum (2016) (XP: 283 g/kg DM; XF: 125 g/kg DM). Therefore, harvesting in an early stage of maturity should be aspired to gain alfalfa leaves of highest possible quality. However, Sen et al. (1998) have reviewed that contents of antinutritional saponins were found to be higher in immature plants than in more mature plants. Thus, the harvest of AL/ALLT in an earlier stage might have led to higher saponin contents. The small differences in saponin contents between AL and ALLT could be due to the different harvest dates (4 days difference). The lower protein solubility of AL (40%) compared with ALLT (54%) might indicate a damage of proteins due to the stronger heat treatment (100-600°C) during the drying process.

Since the registered animal losses in this feeding trial were low and no statistical differences between feeding groups occurred, the influence of alfalfa leaves on mortality can be excluded.

The growth performance of the control group was at a slightly lower level compared to the performance data for male Hubbard JA-757 broilers (light feed type (2900 kcal/kg \pm 13.8 MJ/kg DM)) given by the breeding company (Hubbard, 2016). The control group attained the highest final body weight (2204 g) of all feeding groups. With increasing alfalfa leaf contents, lower body weights were found in AL/ALLT groups. Compared with the calculated diets, few inconsistencies were found in the analysed feed mixtures (higher AME_N contents in AL2 (P2) and AL3 (P2); lower XP content in AL3 (P1); lower methionine/AME_N and valine/AME_N relations), but there is no evidence that they were responsible for the lowered growth performance. On the basis of the significantly lower feed conversion and a numerically higher final fattening weight in group ALLT5 compared with AL4, it can

be assumed that feed and especially protein utilization was slightly improved in this group due to the higher protein solubility of the ALLT5 diet.

The present study showed that feed consumption and growth performance decreased with increasing levels of alfalfa leaves in the diets. Feed intake of poultry is influenced by factors such as energy content, colour and palatability of the diet. It is well known that feed intake of broilers correlates with the AME_N content, enhancing with low AME_N contents and vice versa (Flachowsky, 1973; Peter, Dänicke, & Jeroch, 1997; Würzner & Lettner, 1984). The produced feed mixtures showed equal levels of AME_N within each phase. Therefore, an influence of AME_N levels on feed intake can be excluded.

Furthermore, the growingly greener and darker colour of feed mixtures of AL/ALLT groups might have negatively affected the feed intake. However, studies about preference of feed colour do not demonstrate a clear aversion of chickens to green feeds. In a study of Hurnik, Jerome, Reinhart, and Summers (1971), white Leghorn laying hens showed a preference for blue-coloured feed, followed by green, yellow and red. Khosravinia (2007) studied the preference of broiler chickens for coloured feed (white, yellow, orange, red and green) in various lighting colours and lighting intensities. No significant effects on feed intake were recognized, when the feed colour was taken as a fixed effect in the model (along with the other parameters). Thus, the decreasing acceptability of feed mixtures containing increasing AL/ALLT contents was probably not caused by the green colour of the pellets.

A bitter taste is considered as a factor influencing feed intake. Alfalfa saponins appear as glycosides of different aglycones such as zanhic acid, medicagenic acid, soyasapogenol and hederagenin (Oleszek et al., 1990; Oleszek et al., 1992). One, two or three sugar chains can be attached to the aglycone (mono-, bis- or tridesmosidic form). Biological activity, such as haemolytic, antimicrobial, fungistatic, allelopathic and antinutritional activities, strongly depends on the chemical structure of saponins (Cheeke, 1971; Oleszek & Jurzysta, 1987; Price, Johnson, Fenwick, & Malinow, 1987). Sensory test trials with human volunteers indicated that zanhic acid tridesmoside is the most bitter and throat-irritating compound of all tested saponins isolated from alfalfa aerial parts (Oleszek et al., 1992). Oleszek et al. (1992) assumed that the palatability of diets containing alfalfa and thus feed intake could be reduced if similiar effects were found in animals. In the present study, the results of the semi-quantitative saponin analysis of the alfalfa leaves AL and ALLT proved the occurrence of several individual saponins in both materials. In a two-choice feed preference test with alfalfa-free and alfalfa-containing diets, chickens preferred the alfalfa-free diet over diets with levels of

10% or more alfalfa meal (Cheeke, Powley, Nakaue, & Arscott, 1983). It was demonstrated that poultry is able to detect bitter substances by responding with feed rejection (Cheeke et al., 1983; Ueda & Kainou, 2005). Chickens possess three bitter taste receptor genes (Shi & Zhang, 2006). Bitter taste receptors occur not only in the oral cavity but also in the gastrointestinal tract (Behrens, Prandi, & Meyerhof, 2017).

Besides palatability, other factors affecting the lower part of the digestive tract might be responsible for a decreased feed intake. Ueda, Kakutou, and Ohshima (1996) showed that the addition of alfalfa saponin to diets led to decreased feed intake and body weight gain as well as to a delayed crop emptying and passage rate of ingesta. As alfalfa saponins inhibit smooth muscle activity (Cheeke, 1971), Cheeke (1983) also suggested that saponins might reduce peristalsis and passage rate and therefore might account for the decreased feed intake.

According to Ueda, Matsumoto, and Tanoue (2004), the delayed crop emptying caused by saponins may occur as a secondary effect to adverse intestinal effects. Several studies describe such effects. Saponins can reduce transmural potential difference (PD) (Johnson, Gee, Price, Curl, & Fenwick, 1986). Among some structurally divergent alfalfa saponins, the reduction of PD by zanhic acid glycosides was much greater than by glycosides of medicagenic acid (Oleszek, Nowacka, Gee, Wortley, & Johnson, 1994). Some saponins increase the permeability of intestinal mucosal cells and inhibit active nutrient transport. Furthermore, the uptake of substrates to which the gut would usually be impermeable is facilitated (Johnson et al., 1986). Johnson et al. (1986) suggested that permeabilized enterocytes would be quickly lost by exfoliation, possibly increasing the rate of crypt cell proliferation. As shown by Gee and Johnson (1988), the rate of crypt cell mitosis in the proximal intestines of saponin-treated rats was faster than the controls, although not significant. Furthermore, an enlargement of crypts was recognized, which provided further evidence of an increased mitosis rate. In the present study, no statistically significant differences for crypt and villus length were measured. However, crypt hyperplasia was found more often in alfalfa leaf groups than in the control, which might also indicate an increase in cell replacement.

Intestinal effects possibly affected nutrient digestion and absorption and therefore might have contributed to decreased feed intake as well as growth depression in alfalfa leaf groups. It is obvious that the lowered feed consumption of AL/ALLT groups accounted for lower growth performance. Nevertheless, effects on the digestive tract due to saponins might explain the lower weight gains of groups fed

diets with 5% and more alfalfa leaves (in P1: AL3 compared to AL2 and C; in P2: AL2 compared to C), although feed consumption only decreased at levels of 10% alfalfa leaves and more. In contrast, a previous study (Pleger et al., 2018) showed satisfying performances of broilers fed with alfalfa whole plant meal from a different harvest (variety Dakota, begin of bloom, 4th cut; Table 5). This might be due to the fact that the concentration of some saponins (e. g. zanhic acid) is higher in leaves (Cheeke, 1983; Livingston, Whitehand, & Kohler, 1977; Sen et al., 1998). Consequently, the results of the present study give a strong hint that the occurrence of saponins in the used alfalfa leaves might have been responsible for the depression of the broiler performance.

Alfalfa is rich in carotenoids, which was approved by the results of the carotene analysis of the alfalfa leaves (AL: 151 mg/kg; ALLT: 121 mg/kg). Carotenoids are added to diets of broilers to achieve a desirable yellow pigmentation of broiler carcasses, which is demanded by the consumer (Castañeda, Hirschler, & Sams, 2005; Hencken, 1992; Sunde, 1992). Ponte et al. (2004) reported a significant decrease in redness (a^*) as well as a significant increase in yellowness (b^*) of the skin colour of broilers consuming higher percentages of alfalfa meal. These results are in agreement with the results of the present study, showing less developed red tones in the skin and abdominal fat. As expected, all broilers fed alfalfa leaves presented higher b^* -values than the control. Yellowness of the meat significantly intensified by alfalfa leaf levels from 10% to 15% (AL2 to AL3) (Table 11), whereas the increase in yellowness of skin and abdominal fat was only numerical. Levels of 20% (AL4, ALLT5) did not lead to a significant additional intensification of the colour. The results presented in Figure 1a, b and c show that the yellowness of the skin, meat and fat intensified as a function of the carotene content in the diets up to a carotene level of approximately 20 mg/kg alfalfa leaves. Calculated by L^* , a^* , and b^* , parameter dE^*ab expresses colour differences compared to a reference (broiler of the control group), which are visual for the consumer. The increasing dE^*ab values of the alfalfa leaf groups illustrate the large colour differences of skin, meat and abdominal fat in comparison to the control, which were mainly caused by the deep yellow colour. Hence, the utilization of alfalfa leaves as a protein feed in diets would contribute to a desirable yellow pigmentation of the broiler carcasses and could be used as a distinctive feature for marketing.

Conclusion

According to their protein and amino acid profile and human-inedibility, alfalfa leaves could be a valuable source of amino acids for broilers in organic and sustainable agriculture systems. However, the present study showed that even 5% of alfalfa leaves in broiler diets can lead to detrimental effects on chickens' performance. It is likely that antinutritional saponins have adversely affected the chickens' performance by influencing feed intake and intestinal processes. Therefore, it is mandatory to characterize the biological activity of alfalfa saponins concerning antinutritional aspects (bitterness, throat-irritation, intestinal effects). Particularly zanhic acid glycosides seem to have a major impact on palatability. Effects of purified alfalfa saponins on chickens' performance have to be studied to identify the relevant antinutritional saponins and to define limit values for the utilization of alfalfa leaves in the feeding of chickens. With this knowledge, alfalfa varieties could be examined concerning their specific contents of relevant individual saponins.

Acknowledgements

This study was supported by funds of the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) based on a decision of the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE; grant number 2815OE039). The authors thank the technical staff of the involved laboratories for excellent assistance.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Animal Welfare Statement

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to. No ethical approval was required for the present feeding trial. However, European Union (EU) standards on the protection of animals used for scientific purposes and feed legislation have been met.

References

- Araba, M., & Dale, N. M. (1990). Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poultry Science*, 69, 76-83. <https://doi.org/10.3382/ps.0690076>
- Balde, A. T., Vandersall, J. H., Erdman, R. A., Reeves, J. B., & Glenn, B. P. (1993). Effect of stage of maturity of alfalfa and orchardgrass on in situ dry matter and crude protein degradability and amino acid composition. *Animal Feed Science and Technology*, 44, 29-43. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90035-I](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90035-I)
- Behrens, M., Prandi, S., & Meyerhof, W. (2017). Taste receptor gene expression outside the gustatory system. In Krautwurst, D. (Ed.), *Taste and Smell* (pp 1-34). Springer International Publishing: Cham, Switzerland. https://doi.org/10.1007/7355_2014_79
- Bellof, G., Schmidt, E., & Ristic, M. (2005). Einfluss abgestufter Aminosäuren-Energie-Verhältnisse im Futter auf die Mastleistung und den Schlachtkörperwert einer langsam wachsenden Herkunft in der ökologischen Broilermast. [Effect of graded essential amino acids to energy ratios in diets for organic chicken production on fattening performance and carcass yield.] *European Poultry Science*, 69, 252-260.
- Castañeda, M. P., Hirschler, E. M., & Sams, A. R. (2005). Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. *Poultry Science*, 84, 143–147. <https://doi.org/10.1093/ps/84.1.143>
- Cheeke, P. R. (1971). Nutritional and physiological implications of saponins: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 51, 621-632. <https://doi.org/10.4141/cjas71-082>
- Cheeke, P. R. (1983). Biological properties and nutritional significance of legume saponins. In Telek, L., & Graham H. D. (Eds.), *Leaf Protein Concentrates* (pp. 396-414). Westport, Connecticut: Avi Publishing Company, Inc.
- Cheeke, P. R. (1996). Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. In Waller, G. R., & Yamasaki, K. (Eds.), *Saponins used in food and agriculture* (pp. 377-386). New York: Plenum Press.
- Cheeke, P. R., Powley, J. S., Nakae, H. S., & Arscott, G. H. (1983). Feed preference responses of several avian species fed alfalfa meal, high- and low-saponin alfalfa, and quinine sulfate. *Canadian Journal of Animal Science*, 63, 707-710. <https://doi.org/10.4141/cjas83-080>

- Cohen, S. A., & Michaud, D. P. (1993). Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 211, 279-287. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1270>
- DLG, Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (2014). *DLG-Futterwerttabellen Schweine*, 7th ed. Frankfurt a.M., Germany: DLG-Verlag.
- Ertl, P., Steinwider, A., Schönauer, M., Krimberger, K., Knaus, W., & Zollitsch, W. (2016). Net food production of different livestock: A national analysis for Austria including relative occupation of different land categories. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 67, 91–103. <https://doi.org/10.1515/boku-2016-0009>
- European Commission (2008). Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control.
- European Commission (2009). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed.
- European Commission (2018). Commission Implementing Regulation (EU) No 2018/1584 of 22 October 2018 amending Regulation (EC) No 889/2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control.
- European Union (2007). Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91.
- Flachowsky, G. (1973). Der Einfluß eines variierenden Energie- und Rohproteingehaltes im Mischfutter auf die Lebendmassezunahme und den Futter-, Rohprotein- und Energieverzehr sowie -aufwand von Broilern. *Archives of Animal Nutrition*, 23, 225-235.
- Gee, J. M., & Johnson, I. T. (1988). Interactions between hemolytic saponins, bile salts and small intestinal mucosa in the rat. *The Journal of Nutrition*, 118, 1391-1397. <https://doi.org/10.1093/jn/118.11.1391>

- GfE, Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (1999). Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. *Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler)*, Frankfurt a.M., Germany: DLG-Verlag.
- Hencken, H. (1992). Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*, 71, 711-717. <https://doi.org/10.3382/ps.0710711>
- Hoischen-Taubner, S., & Sundrum, A. (2016). Ermittlung des Futterwertes und der Verdaulichkeiten der Blattmassen von Luzerne und Perserklee. [Determining the feeding value and digestibility of the leaf mass of alfalfa (*Medicago sativa*) and various types of clover.] *Schlussbericht BÖLN-Projekt*, FKZ 11OE055. <http://orgprints.org/30426/>
- Hubbard (2016). Fiche Produit Hubbard - Votre croisement: Premium no recessive > JA57 + Fast growth > M77 = JA757. <https://www.hubbardbreeders.com/fr/produits/croisements/cat/premium-non-recessive/fast-growth/7931-ja757.html>
- Huhman, D. V., & Sumner, L. W. (2002). Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry*, 59, 347-360. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00432-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00432-0)
- Hurnik, J. F., Jerome, F. N., Reinhart, B. S., & Summers, J. D. (1971). Color as a stimulus for feed consumption. *Poultry Science*, 50, 944-949. <https://doi.org/10.3382/ps.0500944>
- Jentsch, W., Schiemann, R., & Wiesemüller, W. (1991). Zur energetischen Verwertung von Luzerneblatt durch adulte Schweine. *Archives of Animal Nutrition*, 41, 237-244. <https://doi.org/10.1080/17450399109428466>
- Johnson, I. T., Gee, J. M., Price, K., Curl, C., & Fenwick, G. R. (1986). Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *The Journal of Nutrition*, 116, 2270-2277. <https://doi.org/10.1093/jn/116.11.2270>
- Kalač, P., Price, K. R., & Fenwick, G. R. (1996). Changes in saponin content and composition during the ensilage of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Food Chemistry*, 56, 377-380. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00185-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00185-9)
- Khosravinia, H. (2007). Preference of broiler chicks for color of lighting and feed. *The Journal of Poultry Science*, 44, 213-219.

<https://doi.org/10.2141/jpsa.44.213>

- Livingston, A. L., Whitehand, L. C., & Kohler, G. O. (1977). Microbiological assay for saponin in alfalfa products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 60, 957-960.
- Naumann, C., & Bassler, R. (2012). *VDLUFA Methodenbuch Band III - Die chemische Untersuchung von Futtermitteln*. Darmstadt, Germany: VDLUFA Verlag.
- Oleszek, W., & Jurzysta, M. (1987). The allelopathic potential of alfalfa root medicagenic acid glycosides and their fate in soil environments. *Plant and Soil*, 98, 67-80.
- Oleszek, W., Jurzysta, M., Ploszynski, M., Colquhoun, I. J., Price, K. R., & Fenwick, G. R. (1992). Zahnic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 191-196. <https://doi.org/10.1021/jf00014a005>
- Oleszek, W., Nowacka, J., Gee, J. M., Wortley, G. M., & Johnson, I.T. (1994). Effects of some purified alfalfa (*Medicago sativa*) saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 35-39. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650107>
- Oleszek, W., Price, K. R., Colquhoun, I. J., Jurzysta, M., Ploszynski, M., & Fenwick, G. R. (1990). Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root saponins: Their activity in relation to a fungal bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1810-1817. <https://doi.org/10.1021/jf00099a006>
- Peter, W., Dänicke, S., & Jeroch, H. (1997). Einfluß der Ernährungsintensität auf den Wachstumsverlauf und die Mastleistung französischer „LABEL“ Broiler. *Archives Animal Breeding*, 40, 69-84.
- Pleger, L., Weindl, P. N., Weindl, P. A., Carrasco, L. S., Kienzle, E., & Bellof, G. (2018). Precaecal digestibility of alfalfa products as an organic feedstuff in broilers. In *Proceedings of the 22nd Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, September 6th - 8th 2018, Munich, Germany* (p. 40). Berlin, Germany: ESVCN.
- Ponte, P. I. P., Ferreira, L. M. A., Soares, M. A. C., Aguiar, M. A. N. M., Lemos, J. P. C., Mendes, I., & Fontes, C. M. G. A. (2004). Use of cellulases and xylanases to supplement diets containing alfalfa for broiler chicks: Effects on bird performance and skin color. *Journal of Applied Poultry Research*, 13, 412-420.

<https://doi.org/10.1093/japr/13.3.412>

Price, K. R., Johnson, I. T., Fenwick, G. R., & Malinow, M. R. (1987). The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26, 27-135. <https://doi.org/10.1080/10408398709527461>

Ritteser, C., & Grashorn, M. (2015). Bestimmung präcecaler Verdaulichkeitskoeffizienten für heimische Energiefuttermittel für die Hühnermast. [Estimation of ileal nutrient digestibility of native energy and protein feeding stuffs for organic broilers.] *Schlussbericht BÖLN-Projekt FKZ 11OE070*. <http://www.orgprints.org/29363/>

Schader, C., Muller, A., El-Hage Scialabba, N., Hecht, J., Isensee, A., Erb, K.-H., Smith, P., Makkar, H. P. S., Klocke, P., Leiber, F., Schwegler, P., Stolze, M., & Niggli, U. (2015). Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. *Journal of the Royal Society Interface*, 12, 20150891. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2015.0891>

Sen, S., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 131–140. <https://doi.org/10.1021/jf970389i>

Shi, P., & Zhang, J. (2006). Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 292-300. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj028>

Sommer, H., & Sundrum, A. (2015). Ganzpflanze und Blattmasse verschiedener Grünleguminosen als Eiweißquelle in der Schweinefütterung. In Häring, A. M., Hörning, B., Hoffmann-Bahnsen, R., Luley, H., Luthardt, V., Pape, J., & Trei, G. (Eds.), *Am Mut hängt der Erfolg: Rückblicke und Ausblicke auf die ökologische Landbewirtschaftung. Beiträge zur 13. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*, Eberswalde, 17.-20. März 2015 (pp. 350-353). Berlin, Germany: Verlag Dr. Köster. <https://orgprints.org/27148/>

Sunde, M. L. (1992). Symposium: The scientific way to pigment poultry products - Introduction to the symposium. *Poultry Science*, 71, 709–710. <https://doi.org/10.3382/ps.0710709>

Tautenhahn, R., Böttcher, C., & Neumann, S. (2008). Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics*, 9, 504. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-504>

- Ueda, H., & Kainou, S. (2005). Aversion to quinine is associated with taste sensation in chicks. *The Journal of Poultry Science*, 42, 254-262. <https://doi.org/10.2141/jpsa.42.254>
- Ueda, H., Kakutou, Y., & Ohshima, M. (1996). Growth-depressing effect of alfalfa saponin in chicks. *Animal Science and Technology (Japan)*, 67, 772-779.
- Ueda, H., Matsumoto, S., & Tanoue, K. (2004). Growth response and crop emptying in chicks force-fed diets containing various saponins. *The Journal of Poultry Science*, 41, 298-306. <https://doi.org/10.2141/jpsa.41.298>
- Weltin, J., Carrasco, S., Berger, U., & Bellof, G. (2014). Luzernesilage aus spezieller Nutzung und technologischer Aufbereitung in der ökologischen Geflügel- und Schweinefütterung. [Alfalfa-silage after suitable preparation in organic poultry and pig feeding.] *Schlussbericht BÖLN-Projekt*, FKZ 11OE077. <http://orgprints.org/26279/1/26279-11OE077-hswt-bellof-2014-luzernesilage-tierernaehrung.pdf>
- Wiens, M. J., Entz, M. H., Martin, R. C., & Hammermeister, A. M. (2006). Agronomic benefits of alfalfa mulch applied to organically managed spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 86, 121-131. <https://doi.org/10.4141/P05-069>
- Witten, S., Böhm, H., & Aulrich, K. (2019). Effect of variety and environment on the contents of crude nutrients and amino acids in organically produced cereal and legume grains. *Organic Agriculture*, online first. <https://doi.org/10.1007/s13165-019-00261-7>
- WPSA (1984). Working Group No. 2 Nutrition: The prediction of apparent metabolizable energy values for poultry in compound feeds. *World's Poultry Science Journal*, 40, 181-182.
- WPSA (1989). *European table of energy values for poultry feedstuffs*, 3rd ed. Subcommittee Energy of the Working Group No. 2 Nutrition of the European Federation of Branches of the World's Poultry Science Association, Beekbergen, Netherlands.
- Würzner, H., & Lettner, F. (1984). Unterschiedliche Energiegehalte und Energiefuttermittel in der Geflügelmastration. 1. Mitteilung: Einfluß auf die Mast- und Schlachtleistung sowie die Schlachtkörperzusammensetzung. Sonderdruck aus *Die Bodenkultur*, 35, 65-79.
- Wüstholtz, J., Carrasco, S., Berger, U., Sundrum, A., & Bellof, G. (2016). Silage

from alfalfa (*Medicago sativa*) harvested at an early stage as home-grown protein feed for organic broilers. *European Poultry Science*, 80. <https://doi.org/10.1399/eps.2016.150>

Table 1: Experimental design and levels (%) of alfalfa leaves (AL[†], ALLT[‡]) in diets of male broilers

Feeding group	Feeding phase		
	P1 [§]	P2	P3
	Days 1-14	Days 15-28	Days 29-56
C [¶]	0	0	0
AL2	0	5	10
AL3	5	10	15
AL4	10	15	20
ALLT5	10	15	20

[†]AL: Alfalfa leaves dried by high temperatures

[‡]ALLT: Alfalfa leaves dried by low temperatures

[§]P1: Phase 1; P2: Phase 2; P3: Phase 3

[¶]C: Control group

Table 2: Composition of complete feed mixtures (%) in phases 1, 2 and 3

Ingredients	P1 [†]					P2					P3				
	C [‡]	AL2	AL3	AL4	ALLT5	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5
Alfalfa leaves AL [§] /ALLT [¶]	-	-	5.0	10.0	10.0	-	5.0	10.0	15.0	15.0	-	10.0	15.0	20.0	20.0
Soybean cake	12.0	12.0	12.0	11.0	11.0	10.0	9.0	9.0	9.0	9.0	8.0	6.0	5.0	3.0	3.0
Sunflower cake	17.0	17.0	16.0	15.5	15.5	12.0	11.0	10.5	9.0	9.0	9.0	7.5	7.5	9.0	9.0
Peas	12.0	12.0	10.0	10.0	10.0	10.0	8.0	5.0	4.0	4.0	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Corn	12.0	12.0	16.0	22.6	22.6	9.0	16.8	23.5	25.0	25.0	15.0	28.7	24.0	24.0	24.0
Wheat	16.0	16.0	15.1	18.0	18.0	22.8	20.0	19.0	15.1	15.1	23.8	25.0	26.0	22.0	22.0
Triticale	9.0	9.0	8.0	3.0	3.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	15.0	9.0	7.4	6.0	6.0
Oat	9.0	9.0	7.0	3.0	3.0	11.0	8.0	4.5	4.0	4.0	11.0	4.0	4.0	3.4	3.4
Barley	9.0	9.0	7.0	3.0	3.0	11.0	8.0	4.5	4.0	4.0	11.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Rapeseed oil	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	1.0	-	-	1.5	3.0	3.0
Mineral premix [§]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Calcium carbonate	0.9	0.9	0.7	0.6	0.6	0.6	0.5	0.3	-	-	0.6	0.2	-	-	-
Monocalcium phosphate	0.5	0.5	0.6	0.7	0.7	-	0.1	0.1	0.3	0.3	-	-	-	-	-
Sodium chloride	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Note. Mineral premix provided the following per kilogram of premix: Ca 125 g, P 20 g, Na 30 g, Mg 20 g, Cl 35 g, Cu 200 mg, Zn 1300 mg, Mn 2100 mg, J 15 mg, Se 8 mg, vitamin A 100000 IU, vitamin D3 20000 IU, vitamin E 1000 mg, vitamin K 40 mg, vitamin B1 120 mg, vitamin B2 150 mg, vitamin B6 120 mg, vitamin B12 400 µg, niacinamide 1600 mg, pantothenic acid 350 mg, folic acid 35 mg, biotin 7000 µg, choline chloride 50000 mg.

[†]P1: Phase 1 (day 1-14); P2: Phase 2 (day 15-28); P3: Phase 3 (day 29-56)

[‡]C: Control

[§]AL: Alfalfa leaves dried by high temperatures

[¶]ALLT: Alfalfa leaves dried by low temperatures

Table 3: Analysed nutritional composition (g/kg DM) of alfalfa leaves and further protein feeds in the feeding trial with male broilers

Item		AL [†]	ALLT [‡]	Soybean cake	Sunflower cake	Peas
Dry matter	g/kg	901	897	884	895	866
Crude ash	g/kg	111	102	62.6	73.6	26.6
Crude protein	g/kg	219	228	442	418	226
Crude fat	g/kg	43.8	37.9	114	140	20.6
Crude fibre	g/kg	174	202	67.1	191	58.2
NfE	g/kg	453	430	314	178	669
Starch	g/kg	68.3	47.8	92.6	44.1	543
Sugar	g/kg	69.8	72.7	93.2	55.1	52.7
Lysine	g/kg	13.1	14.1	26.4	14.7	15.4
Methionine	g/kg	3.64	3.72	6.74	8.74	2.31
Cysteine	g/kg	2.85	3.06	7.34	6.77	3.41
Threonine	g/kg	9.69	10.3	17.2	14.4	8.16
Tryptophan	g/kg	3.31	3.64	n.d. [§]	n.d.	n.d.
Arginine	g/kg	9.89	10.6	31.4	32.3	17.2
Alanine	g/kg	12.1	12.5	18.7	16.6	9.41
Asparagine	g/kg	27.7	30.7	47.5	36.0	24.0
Glutamine	g/kg	22.1	23.0	77.8	76.9	36.5
Glycine	g/kg	10.4	11.0	18.8	23.7	9.48
Histidine	g/kg	5.13	5.65	12.0	10.6	5.18
Isoleucine	g/kg	8.66	9.46	18.2	15.0	8.50
Leucine	g/kg	15.8	16.6	32.7	24.7	15.4
Phenylalanine	g/kg	10.3	11.0	22.3	18.7	10.6
Proline	g/kg	11.4	12.5	22.7	16.9	9.35
Serine	g/kg	9.07	10.1	22.4	17.1	10.6
Tyrosine	g/kg	6.82	7.18	14.1	9.71	6.61
Valine	g/kg	11.0	12.0	19.4	18.5	9.71
Phosphorus	g/kg	2.60	2.70	n.d.	n.d.	n.d.
Calcium	g/kg	29.1	28.4	n.d.	n.d.	n.d.
Sodium	g/kg	0.110	0.080	n.d.	n.d.	n.d.
Magnesium	g/kg	2.30	2.10	n.d.	n.d.	n.d.
Potassium	g/kg	22.9	23.4	n.d.	n.d.	n.d.
AME _N [¶]	MJ/kg	6.33	6.19	12.3	10.5	13.1
Protein solubility	%	39.7	54.2	n.d.	n.d.	n.d.

[†]AL: Alfalfa leaves dried by high temperatures

[‡]ALLT: Alfalfa leaves dried by low temperatures

[§]n.d.: not detected

[¶]AME_N: aspired apparent metabolizable energy (N-corrected), calculated according to WPSA (1989)

Table 4: Saponins putatively identified by negative-ion UPLC-HRMS in alfalfa leaves used in the experimental diets

Peak No	Saponins putatively identified	Aglycone	Rt (min)	Accurate mass measured	Mass error (ppm)
1	3-GlcA-28-Glc-Hederagenin	Hederagenin	18.64	809.4228	16.33
2	3-GlcA-28-Glc-Hederagenin	Hederagenin	13.62	809.4228	16.33
3	3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Api-Zanhic acid	Zanhic acid	10.79	1251.5743	2.48
4	3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagenic acid	Medicagenic acid	12.97	1103.5241	4.80
5	3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagenic acid	Medicagenic acid	16.57	1103.5241	4.80
6	3-Glc-medicagenic acid	Medicagenic acid	18.80	663.3662	16.45
7	3-Glc-medicagenic acid	Medicagenic acid	19.51	663.3662	16.45
8	3-Glc-medicagenic acid	Medicagenic acid	16.75	663.3662	16.45
9	Azukisaponin II	Azukisaponin	14.26	795.4426	13.20
10	Azukisaponin II	Azukisaponin	19.79	795.4426	13.20
11	dHex-Hex-HexA-Soyasapogenol A	Soyasapogenol A	40.02	957.5036	6.06
12	HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-Zanhic acid	Zanhic acid	13.98	1235.5454	5.56
13	Hex-Hederagenin	Hederagenin	21.93	633.3923	16.19
14	Hex-HexA-Aglycone A	Unknown	16.45	823.4023	14.25
15	Hex-HexA-Aglycone A	Unknown	17.15	823.4023	14.25
16	Hex-Pen-Hederagenin	Hederagenin	19.52	765.4344	14.62
17	Malonyl-Hex-Hex-HexA-Bayogenin	Bayogenin	14.43	1073.4850	1.81
18	Malonyl-Hex-Hex-HexA-Bayogenin	Bayogenin	37.88	1073.4850	1.81
19	Malonyl-Hex-Hex-HexA-Bayogenin	Bayogenin	20.28	1073.4850	1.81
20	Medicagenic acid	Medicagenic acid	23.16	501.3141	14.95
21	Medicagenic acid	Medicagenic acid	20.15	501.3141	14.95
22	Medicoside J	Medicagenic acid	11.87	1073.5022	13.67
23	Medicagenic acid 3-O-b-D-glucuronide	Medicagenic acid	19.47	677.3460	11.44
24	Medicagenic acid 3-O-b-D-glucuronide	Medicagenic acid	16.33	677.3460	11.44
25	Medicagenic acid derived	Medicagenic acid	12.98	1104.5307	4.88
26	Medicagenic acid derived	Medicagenic acid	13.85	1104.5307	4.88
27	Medicoside H	Medicagenic acid	14.19	941.4624	13.00
28	Medicoside H	Medicagenic acid	14.96	941.4624	13.00
29	Pen-Hex-Hex-Aglycone B	Unknown	40.49	925.4740	8.18
30	Pen-Hex-Hex-Aglycone D	Unknown	18.95	945.5061	3.83
31	Rha-Hex-Hex-Hex-Bayogenin	Bayogenin	38.58	1119.5524	3.21
32	Soyasapogenol A	Soyasapogenol A	38.89	473.3574	12.03
33	Soyasapogenol B_derived	Soyasapogenol B	11.35	1153.5348	7.96
34	Zanhic acid_derived	Zanhic acid	12.90	949.4441	5.10

Note. Saponin abbreviations: Api: apiofuranose; Ara: arabinose; Glc: glucose; GlcA: galacturonic acid; Hex: hexose; HexA: hexuronic acid; dHex: 6-deoxyhexose; Pen: pentose; Rha: rhamnose.

Table 5: Relative contents of eight major putatively identified saponins expressed as umbelliferone equivalent in alfalfa leaves used in the experimental diets and alfalfa whole plant meal from a different harvest

Peak No	Saponins	Aglycone	Saponin contents expressed as umbelliferone equivalent ($\mu\text{g/g DM}$) (n=3) (RSE [†] %)		
			AL [‡]	ALLT [§]	Alfalfa whole plant meal
8	3-Glc-Medicagenic acid	Medicagenic acid	44.6 (19)	2.04 (15)	2.95 (42)
25	Medicagenic acid derived	Medicagenic acid	51.4 (40)	50.3 (4)	21.3 (32)
14	Hex-HexA-Aglycone A	Unknown	61.4 (46)	70.5 (8)	28.0 (31)
10	Azukisaponin II	Azukisaponin	62.7 (36)	58.6 (5)	34.2 (32)
27	Medicoside H	Medicagenic acid	84.2 (20)	58.5 (6)	27.9 (22)
23	Medicagenic acid 3-O-b-D-glucuronide	Medicagenic acid	89.3 (42)	87.9 (13)	13.0 (16)
4	3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagenic acid	Medicagenic acid	101 (32)	94.4 (5)	40.0 (36)
12	HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-Zanhic acid	Zanhic acid	200 (30)	175 (5)	47.9 (35)

Note. Saponin abbreviations: Ara: arabinose; Glc: glucose; Hex: hexose; HexA: hexuronic acid; dHex: 6-deoxyhexose; Pen: pentose; Rha: rhamnose.

[†]RSE: Relative standard error of saponin concentration measured for three replicates

[‡]AL: Alfalfa leaves dried by high temperatures

[§]ALLT: Alfalfa leaves dried by low temperatures

Table 6: Analysed nutritional composition (g/kg DM) of feed mixtures in phases 1, 2 and 3

Item		P1 [†]				P2					P3				
		C, AL2	AL3	AL4	ALLT5	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5
Dry matter	g/kg	909	917	920	918	915	917	916	920	924	916	918	919	922	924
Crude ash	g/kg	74.6	70.6	75.9	76.3	61.8	63.6	64.7	68.1	65.8	59.7	61.3	63.0	65.8	63.9
Crude protein	g/kg	227	215	225	226	202	200	198	197	196	177	175	174	176	175
Crude fat	g/kg	62.1	53.5	60.5	64.1	58.6	66.5	69.1	60.9	58.0	56.8	62.5	67.5	82.8	82.3
Crude fibre	g/kg	66.1	63.6	59.2	63.0	58.2	60.2	59.8	61.8	70.4	58.0	55.1	58.3	65.1	70.4
Starch	g/kg	406	427	401	391	453	449	448	423	417	492	477	461	424	425
Sugar	g/kg	46.3	46.4	50.8	49.8	41.3	44.1	45.9	48.3	47.1	38.7	43.9	45.2	45.9	47.8
Lysine	g/kg	11.6	10.8	11.3	11.0	9.90	9.83	9.34	9.56	9.76	8.02	8.27	8.24	8.69	8.63
Methionine	g/kg	3.72	3.59	3.73	3.77	3.25	3.29	3.17	3.28	3.26	2.85	2.91	2.79	3.10	2.82
Cysteine	g/kg	4.10	3.92	3.92	3.94	3.74	3.64	3.52	3.43	3.50	3.44	3.24	3.02	3.18	3.06
Threonine	g/kg	8.72	8.20	8.92	8.41	7.55	7.45	7.33	7.71	7.61	6.56	6.59	6.73	7.04	6.88
Tryptophan	g/kg	2.69	2.57	2.71	2.77	2.41	2.43	2.21	2.35	2.23	2.05	1.94	2.10	2.14	2.07
Arginine	g/kg	17.0	15.5	16.0	15.4	14.3	13.6	12.9	13.1	12.8	12.2	11.0	10.7	11.0	10.7
AME _N [‡]	MJ/kg	13.2	13.0	13.0	13.0	13.3	13.6	13.6	12.9	12.7	13.5	13.5	13.4	13.4	13.3
Lysine/AME _N	g/MJ	0.891	0.836	0.873	0.852	0.748	0.731	0.691	0.744	0.775	0.598	0.618	0.620	0.656	0.652
Methionine/AME _N	g/MJ	0.286	0.278	0.289	0.293	0.246	0.245	0.235	0.255	0.259	0.212	0.217	0.210	0.234	0.213
Protein solubility	%	88.1	86.7	83.0	83.0	90.6	87.7	82.2	82.7	83.7	87.1	80.3	74.8	70.6	81.2

Note. Diets included the following alfalfa leaf levels (%) in P1-P2-P3: C (Control): 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; and ALLT5: 10-15-20.

[†]P1: Phase 1 (days 1-14); P2: Phase 2 (days 15-28); P3: Phase 3 (days 29-56)

[‡]AME_N: aspired apparent metabolizable energy, calculated according WPSA (1984)

Table 7: Average daily feed consumption (g/bird/d) of male broilers fed diets with increasing levels of alfalfa leaves (LS Means and standard error of the means (*SEM*))

Feed consumption	Feeding group					<i>SEM</i>	<i>p</i> -Value
	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5		
Feed consumption P1 [†]	26.2 ^a	25.7 ^a	23.7 ^{ab}	19.9 ^c	21.9 ^{bc}	0.732	<.001
Feed consumption P2	65.9 ^a	65.0 ^a	57.2 ^b	57.9 ^b	52.2 ^c	1.38	<.001
Feed consumption P3	121 ^a	108 ^b	91.2 ^c	89.5 ^c	89.9 ^c	2.10	<.001
Feed consumption P1-P3	83.7 ^a	76.6 ^b	65.8 ^c	64.2 ^c	63.4 ^c	1.35	<.001

Note. Diets included the following alfalfa leaf levels (%) in P1-P2-P3: C (Control): 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; and ALLT5: 10-15-20.

^{a-c} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments ($p < 0.050$).

[†]P1: Phase 1 (days 1-14); P2: Phase 2 (days 15-28); P3: Phase 3 (days 29-56)

Table 8: Body weight and daily weight gain of male broilers fed diets with increasing levels of alfalfa leaves (LS Means and standard error of the means (*SEM*))

Item		Feeding group					<i>p</i> -Value
		C	AL2	AL3	AL4	ALLT5	
Initial body weight	g	38.1	38.2	38.2	38.3	38.2	.872
<i>SEM</i>		0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	
Body weight P1 [†]	g	267 ^a	266 ^a	240 ^b	242 ^b	236 ^b	<.001
<i>SEM</i>		4.04	4.04	4.04	4.04	4.04	
Body weight P2	g	774 ^a	735 ^b	638 ^c	631 ^c	618 ^c	<.001
<i>SEM</i>		8.21	8.24	8.17	8.07	8.21	
Body weight P3	g	2204 ^a	1876 ^b	1532 ^c	1396 ^d	1472 ^{cd}	<.001
<i>SEM</i>		25.6	25.4	25.6	25.1	25.4	
Daily weight gains P1	g/d	16.4 ^a	16.3 ^a	14.4 ^b	14.6 ^b	14.1 ^b	<.001
<i>SEM</i>		0.296	0.296	0.296	0.296	0.296	
Daily weight gains P2	g/d	36.2 ^a	33.4 ^b	28.5 ^c	27.8 ^c	27.3 ^c	<.001
<i>SEM</i>		0.690	0.690	0.690	0.690	0.690	
Daily weight gains P3	g/d	50.8 ^a	40.5 ^b	31.8 ^c	27.4 ^d	30.3 ^{cd}	<.001
<i>SEM</i>		0.873	0.873	0.873	0.873	0.873	
Daily weight gains P1-P3	g/d	38.5 ^a	32.7 ^b	26.6 ^c	24.3 ^c	25.5 ^c	<.001
<i>SEM</i>		0.580	0.580	0.580	0.580	0.580	

Note. Diets included the following alfalfa leaf levels (%) in P1-P2-P3: C (Control): 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; and ALLT5: 10-15-20.

^{a-d} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments ($p < 0.050$).

[†]P1: Phase 1 (days 1-14); P2: Phase 2 (days 15-28); P3: Phase 3 (days 29-56)

Table 9: Average feed conversion rate (FCR) (kg/kg) of male broilers fed diets with increasing levels of alfalfa leaves (LS Means and standard error of the means (*SEM*))

Item	Feeding group					<i>SEM</i>	<i>p</i> -Value
	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5		
FCR P1 [†]	1.60 ^a	1.58 ^a	1.65 ^a	1.37 ^b	1.55 ^a	0.051	.009
FCR P2	1.82 ^b	1.95 ^{ab}	2.01 ^a	2.09 ^a	1.92 ^{ab}	0.041	.003
FCR P3	2.39 ^d	2.66 ^c	2.87 ^{bc}	3.27 ^a	2.97 ^b	0.059	<.001
FCR P1-P3	2.05 ^d	2.21 ^c	2.35 ^b	2.50 ^a	2.36 ^b	0.033	<.001

Note. Diets included the following alfalfa leaf levels (%) in P1-P2-P3: C (Control): 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; and ALLT5: 10-15-20.

^{a-d} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments ($p < 0.050$).

[†]P1: Phase 1 (days 1-14); P2: Phase 2 (days 15-28); P3: Phase 3 (days 29-56)

Table 10: Carcass weight and section portions of male broilers fed diets with increasing levels of alfalfa leaves (LS Means and standard error of the means (*SEM*))

Item	Feeding group					SEM	p-Value
	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5		
Weight (g)							
Live weight before slaughter	2247 ^a	1889 ^b	1534 ^c	1398 ^d	1459 ^d	19.9	<.001
Cold carcass	1615 ^a	1338 ^b	1063 ^c	960 ^d	1007 ^{cd}	16.9	<.001
Breast	301 ^a	237 ^b	172 ^c	152 ^d	163 ^{cd}	4.60	<.001
Drumsticks	506 ^a	417 ^b	333 ^c	301 ^d	316 ^{cd}	5.37	<.001
Wings	192 ^a	170 ^b	139 ^c	136 ^c	135 ^c	2.33	<.001
Abdominal fat	24.6 ^a	19.7 ^b	15.7 ^{bc}	12.6 ^c	14.2 ^c	1.42	<.001
Proportion (%)							
Carcass yield	71.9 ^a	70.8 ^a	69.3 ^b	68.6 ^b	69.0 ^b	0.426	<.001
Breast	18.7 ^a	17.7 ^b	16.2 ^c	15.8 ^c	16.1 ^c	0.275	<.001
Drumsticks	31.4	31.2	31.3	31.4	31.4	0.202	.945
Wings	11.9 ^d	12.7 ^c	13.1 ^{bc}	14.2 ^a	13.4 ^b	0.142	<.001
Abdominal fat	1.51	1.46	1.46	1.30	1.40	0.110	.696

Note. Diets included the following alfalfa leaf levels (%) in P1-P2-P3: C (Control): 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; and ALLT5: 10-15-20.

^{a-d} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments ($p < 0.050$).

Table 11: Colour values of skin, meat and fat of male broilers fed diets with increasing levels of alfalfa leaves (LS Means and standard error of the means (*SEM*))

Item	Feeding group					<i>p</i> -Value
	C	AL2	AL3	AL4	ALLT5	
Skin						
L *	77.1	76.2	77.1	77.0	76.8	.343
<i>SEM</i>	0.325	0.334	0.325	0.334	0.325	
a *	3.04 ^a	0.986 ^b	-0.761 ^c	-0.664 ^c	-0.614 ^c	<.001
<i>SEM</i>	0.388	0.398	0.388	0.398	0.388	
b *	19.4 ^c	35.9 ^b	39.5 ^{ab}	39.7 ^a	43.0 ^a	<.001
<i>SEM</i>	1.27	1.31	1.27	1.31	1.27	
dE*ab	2.33 ^c	17.3 ^b	21.2 ^a	21.5 ^a	24.6 ^a	<.001
<i>SEM</i>	1.21	1.24	1.21	1.24	1.21	
Meat						
L *	61.1 ^a	60.2 ^{ab}	60.0 ^{ab}	60.8 ^{ab}	59.0 ^b	.010
<i>SEM</i>	0.424	0.435	0.424	0.435	0.424	
a *	9.84 ^b	9.55 ^b	9.90 ^b	10.1 ^{ab}	10.7 ^a	0.008
<i>SEM</i>	0.227	0.233	0.227	0.233	0.227	
b *	10.0 ^c	20.9 ^b	23.7 ^a	24.9 ^a	24.8 ^a	<.001
<i>SEM</i>	0.638	0.654	0.638	0.654	0.638	
dE*ab	1.75 ^c	11.8 ^b	14.5 ^a	15.8 ^a	15.9 ^a	<.001
<i>SEM</i>	0.640	0.657	0.640	0.657	0.640	
Abdominal fat						
L *	68.7 ^a	67.0 ^{bc}	67.2 ^b	66.0 ^c	67.3 ^b	<.001
<i>SEM</i>	0.392	0.402	0.392	0.402	0.392	
a *	6.97 ^a	4.49 ^b	4.26 ^b	3.85 ^b	3.34 ^b	<.001
<i>SEM</i>	0.440	0.452	0.440	0.452	0.440	
b *	15.2 ^c	29.0 ^b	31.0 ^{ab}	30.0 ^b	32.7 ^a	<.001
<i>SEM</i>	0.819	0.840	0.819	0.840	0.819	
dE*ab	2.76 ^c	15.6 ^b	17.7 ^{ab}	17.0 ^b	19.4 ^a	<.001
<i>SEM</i>	0.742	0.761	0.742	0.761	0.742	

Note. Diets included the following alfalfa leaf levels (%) in P1-P2-P3: C: 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; and ALLT5: 10-15-20.

^{a-c} Different superscript letters indicate significant differences between the treatments ($p < 0.050$).

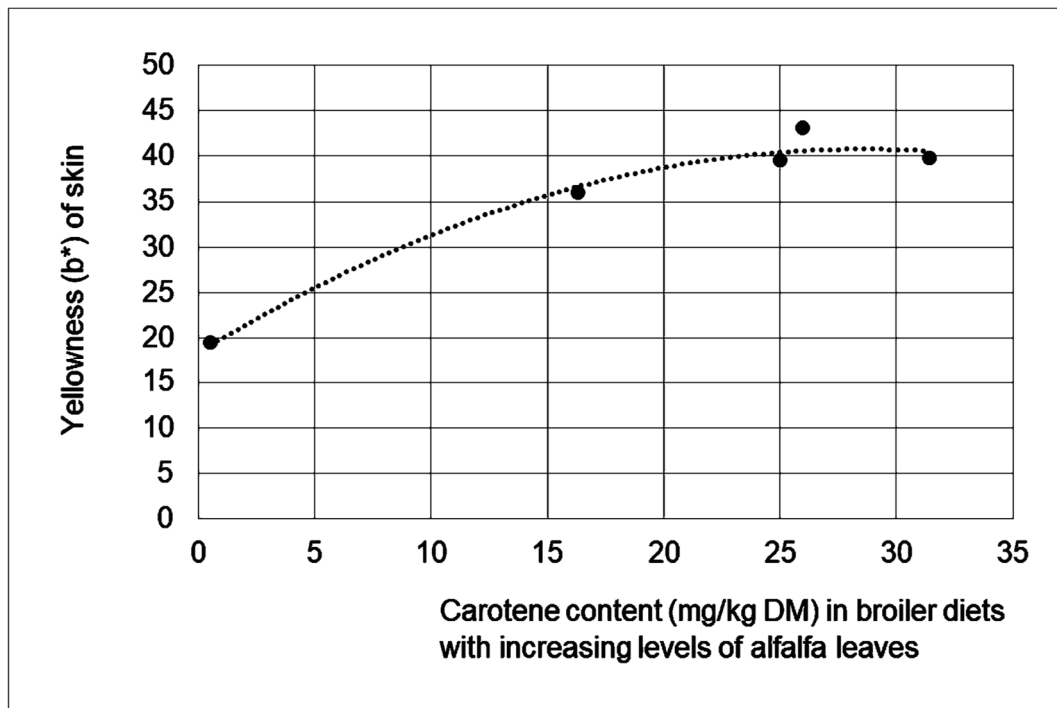


Figure 1a: The regression line ($y = -0.027x^2 + 1.57x + 18.4$; $R^2 = 0.977$) between yellowness (b^*) in the skin of broilers and carotene content in broiler diets with increasing alfalfa leaf levels shows a close relationship, indicating a plateau at carotene levels of about 20 mg/kg alfalfa leaves and more

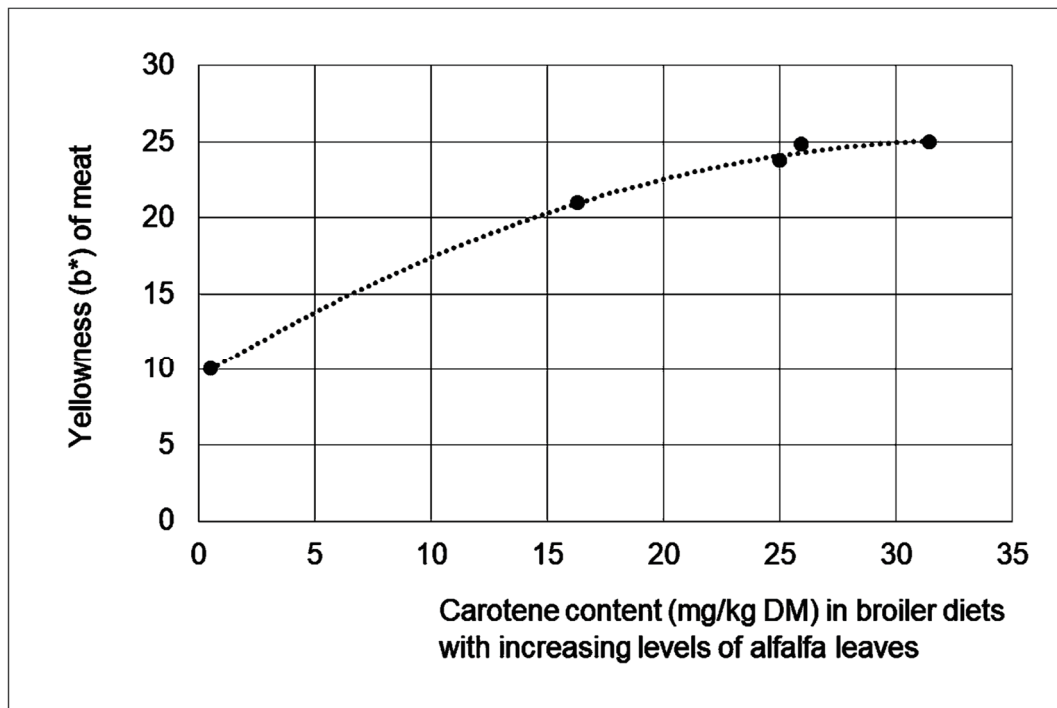


Figure 1b: The regression line ($y = -0.014x^2 + 0.931x + 9.48$; $R^2 = 0.998$) between yellowness (b*) in the meat of broilers and carotene content in broiler diets with increasing alfalfa leaf levels shows a close relationship, indicating a plateau at carotene levels of about 20 mg/kg alfalfa leaves and more.

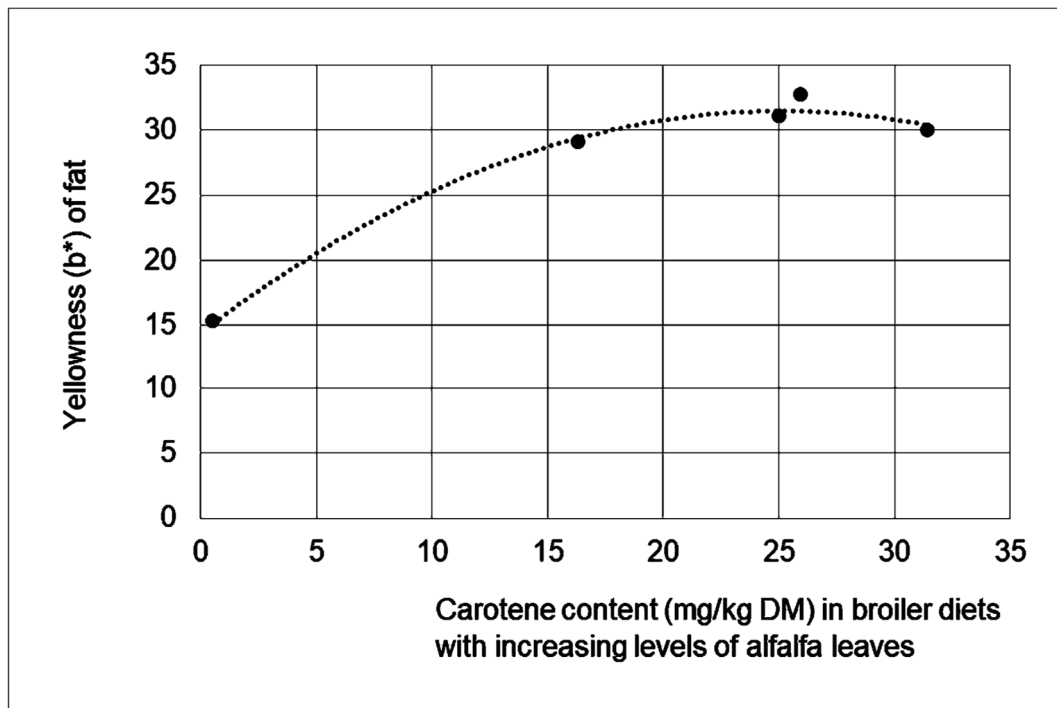


Figure 1c: The regression line ($y = -0.027x^2 + 1.36x + 14.4$; $R^2 = 0.990$) between yellowness (b^*) in the fat of broilers and carotene content in broiler diets with increasing alfalfa leaf levels shows a close relationship, indicating a plateau at carotene levels of about 20 mg/kg alfalfa leaves and more.

4. DISKUSSION

4.1 Verdauungsversuch: Die praecaecale Verdaulichkeit von Rohprotein und Aminosäuren in Blättern und Silagen von Luzerne (*Medicago sativa*) und Rotklee (*Trifolium pratense*) bei Masthühnern

4.1.1 Methodik des durchgeführten Verdauungsversuchs

Der Versuchsaufbau des Verdauungsversuchs unterscheidet sich teilweise vom Aufbau vergleichbarer Versuche zur Bestimmung der pc XP- und AS-Verdaulichkeit einzelner Futtermittel. Üblicherweise erhalten die Tiere vor der Phase der Verdaulichkeitsbestimmung zunächst eine Starter-Futtermischung (RODEHUTSCORD et al., 2004; KLUTH et al., 2005a) oder, je nach Zeitpunkt der Verdaulichkeitsermittlung, eine Grower-Futtermischung (RITTESER und GRASHORN, 2015) ohne das zu prüfende Futtermittel. Im nächsten Schritt erfolgt dann direkt eine Futterumstellung auf die Futtermischungen mit den verschiedenen Zulagestufen des Prüffuttermittels. Die Phase der Verdaulichkeitsbestimmung schließt sich folglich direkt an. In der vorliegenden Studie wurde der Versuchsaufbau für die Untersuchung der für Masthühner ungewöhnlichen Futtermittel bewusst abgeändert. Zwischen der Aufzucht mit einem Öko-Starterfutter und der Verdaulichkeitsermittlung wurde eine Adaptationsphase (Tag 22-28) eingeführt, in der die Tiere zunächst Futtermischungen mit 15 % der jeweiligen Prüffuttermittel erhielten. Dies sollte den Tieren die Möglichkeit geben, sich an die höheren XF-Gehalte und die zu vermutenden antinutritiven Substanzen (v. a. Saponine) in den Luzerne- und Rotkleeprodukten zu gewöhnen. Eine plötzliche Futterumstellung wurde dadurch vermieden. Aufgrund der in 2.1.3.4 beschriebenen negativen Effekte von Saponinen auf die Futteraufnahme und insbesondere auf die Verdauungs- und Absorptionsprozesse erscheint dieses Vorgehen für die Untersuchung dieser Futtermittel sinnvoll. Im Leistungsversuch wurden vermehrt Krypthyperplasien und Lymphfollikelbildungen in den LB-Gruppen (AL/ALLT-Gruppen; AL: alfalfa leaves dried by high temperatures; ALLT: alfalfa leaves dried by low temperatures) in der histologischen Untersuchung des Darms festgestellt. Auch in der Literatur wird von einer erhöhten Zellproliferation (GEE und JOHNSON, 1988), Epithelschäden und Zottenatrophien des Rattendarms durch Saponine berichtet (GEE et al., 1997). Folglich könnte die Fütterung von saponinhaltigen Futtermitteln in der Adaptationsphase zu einer Schädigung des Darms vor der eigentlichen Verdaulichkeitsbestimmung und dadurch zur Beeinflussung der Verdaulichkeit führen. Dies erscheint zunächst als nachteilig für

die Verdaulichkeitsbestimmung. Allerdings würden Luzerne- und Rotkleeblätter in der ökologischen Masthühnerfütterung über eine Mastdauer von 56 Tagen oder mehr verfüttert werden und dabei ebenfalls Auswirkungen auf das Darmepithel haben, welche die Verdaulichkeit der Luzerne- bzw. Rotkleeblätter beeinflussen würden. Somit scheint hier eine Gewöhnung und auch eine eventuelle negative Beeinflussung des Darms und der Verdauungs- und Absorptionsprozesse vor der Verdaulichkeitsbestimmung nicht nachteilig, sondern eher gerechtfertigt zu sein.

In der vorliegenden Verdaulichkeitsstudie wurden außerdem niedrige Zulagestufen der Prüffuttermittel eingesetzt (10 %-15 %-20 %). In den meisten anderen Versuchen zur Bestimmung der pcV von XP und AS kommen hier meist Zulagestufen bis 30 % (RODEHUTSCORD et al., 2004; KLUTH et al., 2005a; SIEGERT et al., 2018) , 50 % (RITTESER und GRASHORN, 2015; SIEGERT et al., 2018) oder 70 % (KLUTH et al., 2009; RITTESER und GRASHORN, 2015; WITTEN et al., 2018) zum Einsatz. Die niedrigeren Zulagestufen bis 20 % sollten einen Einfluss der Prüffuttermittel auf die Futteraufnahme und die Gewichtsentwicklung der Tiere gering halten. Im Versuch traten damit weder signifikante Unterschiede in der Futteraufnahme noch Gewichtsabnahmen während der Fütterung der die Prüffuttermittel enthaltenden Futtermischungen auf. Dieser Ansatz hat sich daher in diesem Zusammenhang als vorteilhaft für die Verdaulichkeitsbestimmung der für Masthühner ungewöhnlichen Prüffuttermittel mit antinutritiven Inhaltsstoffen erwiesen. Grundsätzlich ist aber nicht auszuschließen, dass die niedrigeren Mischungsanteile eine etwas höhere Ungenauigkeit, erkennbar in den generell eher niedrigen Bestimmtheitsmaßen (R^2), bewirkt haben.

Der Vermahlungsgrad bzw. die Partikelgröße beeinflussen sowohl - auf unterschiedliche Weise - die Protein- und AS-Verdaulichkeit von Futtermitteln (CRÉVIEU et al., 1997; KHERAVII et al., 2017; SIEGERT et al., 2018) als auch die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts (MATEOS et al., 2012; KHERAVII et al., 2017). In der durchgeführten Verdaulichkeitsuntersuchung wurden die LB und RKB zu sehr feinen Mehlen vermahlen, während die LS und RKS nur durch Extrusion und Pelletierung zerkleinert wurden. Folglich unterschied sich die Partikelgröße der Prüffuttermittel in den Pellets. Die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der Futtermittel und die Organentwicklung der Masthühner wurden allerdings nicht ermittelt, sodass eine Aussage über deren Einfluss auf die Verdaulichkeit der Prüffuttermittel nicht getroffen werden kann. SIEGERT et al. (2018) empfehlen für zukünftige Studien die Ermittlung der Partikelgrößenverteilung sowie die Untersuchung von Futtermitteln, die ähnlich wie in der Praxis üblich vermahlen sind. Grundsätzlich wäre es in der vorliegenden Verdaulichkeitsuntersuchung für

eine noch bessere Vergleichbarkeit von Vorteil gewesen, die zu prüfenden Futtermittel möglichst auf die gleiche Größe zu vermahlen. Eine feine Vermahlung der Silagen ist allerdings aufgrund ihres niedrigen TM-Gehalts schwer möglich und ließe sich nur durch eine vorherige Trocknung der Silagen umsetzen, was wiederum einen weiteren Bearbeitungsschritt und eine Hitzebehandlung bedeuten würde. Darüber hinaus sind die Trocknung und Vermahlung von Silagen in der Praxis bisher nicht üblich. Wie in der Studie von WÜSTHOLZ et al. (2016) würde in der Praxis den Tieren die Silage zusätzlich zu einer Kraftfuttermischung frei vorgelegt werden. Auch die Pelletierung eines Silage-Kraftfuttermischs, wie sie in der vorliegenden Verdaulichkeitsstudie durchgeführt wurde, ist weniger üblich, aber für die Aufnahme der Silage und die Verdaulichkeitsermittlung essenziell. Die höhere Partikelgröße und der niedrigere TM- und Stärkegehalt von LS und RKS können allerdings auch die Härte bzw. Stabilität von Silage enthaltenden Pellets verringern, wodurch eine gewisse Selektion bestimmter Futterpartikel dennoch möglich sein könnte.

Die untersuchten Luzerne- bzw. Rotkleeprodukte entstammten unterschiedlichen Schnitten und Vegetationsstadien (LS: 3. Schnitt, in der Knospe; LB: 4. Schnitt Mitte der Blüte; RKS: 2. Schnitt, kurz vor der Blüte; RKB: 4. Schnitt, Beginn der Blüte). Die Ernte aller Futtermittel in der gleichen Schnittnummer und im gleichen Vegetationsstadium wäre aufgrund des Einflusses des Vegetationsstadiums auf die Verdaulichkeit für eine bessere Vergleichbarkeit von Vorteil gewesen. Dies gilt auch im Hinblick auf antinutritive Saponine, da deren Vorkommen - wie in 2.1.3.4 bereits dargestellt - von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Diese Thematik wird in 4.3 nochmals ausführlicher betrachtet. Leider konnte ein gleicher Erntezeitpunkt aller Futtermittel aufgrund der zeitlich begrenzten Verfügbarkeit der speziellen Blatterntemaschine nicht realisiert werden.

4.1.2 Diskussion der ermittelten Verdaulichkeitswerte sowie der Vergleich mit Werten aus der Literatur für Geflügel und andere Monogastrier

In der vorliegenden Verdaulichkeitsstudie wurden niedrigere pc Verdaulichkeitswerte für XP und AS in getrockneten Blättern von Luzerne und Rotklee ermittelt als in deren GP-Silagen (3.1, Table 8). Wie bereits beschrieben, können sich die Verdaulichkeitswerte eines Futtermittels zwischen den Geschlechtern und verschiedenen Nutzungsrichtungen von Hühnern sowie bei unterschiedlicher Methodik (Bestimmung in Chymus oder Exkrementen) unterscheiden. Aufgrund der geringen Datenlage zur Verdaulichkeit dieser für das Masthuhn ungewöhnlichen Futtermittel werden die ermittelten Verdaulichkeitswerte im Folgenden auch mit Ergebnissen für Legehybriden, Broilerzuchthennen und anderen monogastrischen Tieren bei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden verglichen und diskutiert. In den Tabellen 5, 6 und 7 werden die Verdaulichkeitswerte von LB, RKB, LS und RKS mit Verdaulichkeitswerten für Geflügel aus der Literatur (XP, Met, Lys, Cystin (Cys), Histidin (His), Arginin (Arg), Threonin (Thr)) verglichen.

Tabelle 5: Vergleich der praecaecalen Verdaulichkeit von XP und AS in Luzerneblättern (LB) der vorliegenden Studie mit Literaturergebnissen (Angaben in %)

Merkmal	Masthühner ^{1,5}	Masthühner ^{2,5}	Masthühner ^{3,5}	Legehybriden ^{4,6}	Broilerzuchthennen ^{4,6}
XP	51	88	26	62	60
Lys	49	87	46	76	68
Met	61	93	41	82	65
Cys	21	90	-	59	52
Thr	40	77	-	-	-
Arg	62	91	-	86	78
His	50	92	-	89	69

¹Eigene Ergebnisse

²RITTESER und GRASHORN (2015); Verdaulichkeitsbestimmung in 6. LW

³PLEGER et al. (2018)

⁴GRUHN und WIESEMÜLLER (1990)

⁵Praecaecale Verdaulichkeit

⁶Kolostomiert

Insbesondere im Vergleich zu den Ergebnissen von RITTESER und GRASHORN (2015) sind die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte für LB auf eher niedrigem Niveau (Tabelle 5). Die von GRUHN und WIESEMÜLLER (1990) untersuchten LB weisen für Broilerzuchthennen in Übereinstimmung mit der eigenen Studie ebenfalls niedrige Verdaulichkeitswerte auf. Gegenüber den

Ergebnissen von PLEGER et al. (2018) sind die Werte auf einem höheren (XP, Met) oder ähnlichen (Lys) Niveau. Verschiedene Studien untersuchten die Rohrnährstoff-Verdaulichkeit von getrockneten LB bei anderen Monogastriern. Dabei wurden Werte auf mittlerem Niveau von 43 % (MESSINGER et al., 2020) bis 69 % (JENTSCH et al., 1991) XP-Verdaulichkeit für das Schwein und 63-64 % für die Ratte (CHEEKE et al., 1978) ermittelt.

Für getrocknete RKB liegen nur wenige *in vivo* Verdaulichkeitswerte vor. GRUHN et al. (1983) untersuchten RKB, welche durch einen hohen Etagenschnitt geerntet wurden, sodass das gewonnene Material vorwiegend aus Blättern bestand. Die Verdaulichkeit von Rohrnährstoffen und AS wurde an kolostomierten Legehennen bestimmt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der praecaecalen Verdaulichkeit von XP und AS in Rotkleeblättern (RKB) der vorliegenden Studie mit Literaturergebnissen (Angaben in %)

Merkmal	Masthühner ^{1,3}	Legehennen ^{2,4}
XP	50	65
Lys	61	72
Met	73	77
Cys	27	56
Thr	48	-
Arg	78	80
His	53	74

¹Eigene Ergebnisse

²GRUHN et al. (1983)

³Praecaecale Verdaulichkeit

⁴Kolostomiert

Die Werte aus der vorliegenden Studie liegen auf einem geringeren Niveau als die von GRUHN et al. (1983) ermittelten Ergebnisse. Die in der vorliegenden Studie geprüften RKB weisen insgesamt eine etwas höhere pcV von XP und AS (Met 73 %, Lys 61 %; siehe 3.1, Table 8) auf als die geprüften LB (Met 61 %, Lys 49 %).

Die Verdaulichkeitswerte von XP und AS in beiden GP-Silagen liegen auf hohem Niveau (3.1, Table 8) und sind deutlich höher als die Ergebnisse von RITTESER und GRASHORN (2015) und auch höher als die von PLEGER et al. (2018) ermittelten Werte (Tabelle 7). Die geprüfte RKS weist dabei eine höhere pcV von Met auf als die geprüfte LS.

Tabelle 7: Vergleich der praecaecalen Verdaulichkeit von XP und AS (Masthühner) in Luzernesilage (LS) und Rotkleesilage (RKS) der vorliegenden Studie mit Literaturergebnissen (Angaben in %)

Merkmal	LS ^{1,4}	RKS ^{1,4}	LS ^{2,4}	LS ^{2,5}	LS ^{3,4}
XP	88	70	43	49	63
Lys	100	88	45	33	60
Met	84	99	50	48	53
Cys	53	85	21	-	-
Thr	78	65	42	49	-
Arg	79	90	30	44	-
His	57	82	15	20	-

¹Eigene Ergebnisse

²RITTESER und GRASHORN (2015)

³PLEGER et al. (2018)

⁴Extrudiert

⁵Nicht extrudiert

In Untersuchungen zur Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit der Rohnährstoffe verschiedener Luzerne- und Rotkleeprodukte beim Mastschwein wurde eine XP-Verdaulichkeit von 56 % in LS und verglichen dazu eine etwas höhere XP-Verdaulichkeit von 69 % in RKS festgestellt (MESSINGER et al., 2020).

Insgesamt fällt in den Verdaulichkeitswerten eine recht große Varianz innerhalb der jeweiligen Luzerne- und Rotkleeprodukte auf. Gründe hierfür könnten unter anderem die Anwendung unterschiedlicher Methoden zur Verdaulichkeitsbestimmung oder die verschiedenen Schnittzeitpunkte der untersuchten Futtermittel und die damit einhergehende Beeinflussung der Verdaulichkeit sein. Darüber hinaus könnte auch das Vorkommen von ANF wie Saponine verantwortlich für die unterschiedlichen Verdaulichkeitswerte sein.

EKLUND et al. (2014) ermittelten für LM pc Verdaulichkeitswerte auf mittlerem Niveau (Met 71 %, Lys 31 %) beim wachsenden Schwein und vermuteten, dass antinutritive Tannine oder Trypsininhibitoren verantwortlich dafür gewesen sein könnten. In welchem Ausmaß Trypsininhibitoren tatsächlich die Verdaulichkeit von Luzerne- und Rotkleeprodukten reduzieren, sollte noch genauer untersucht werden. Da Trypsininhibitoren hitzelabil sind (ASAM et al., 2015), kann allerdings vermutet werden, dass diese in den durch Hitzebehandlung getrockneten Luzerne- und Rotkleeblättern inaktiviert wurden. Die Inaktivierung von Trypsininhibitoren hängt neben der Temperatur auch von der Dauer der Hitzeeinwirkung ab (ASAM et al., 2015). In diesem Zusammenhang müssten weitere Untersuchungen zur adäquaten Hitzebehandlung der Luzerne- und Rotkleeprodukte angestellt werden, um gleichzeitig eine Verringerung der Proteinlöslichkeit (ARABA und DALE, 1990)

und die Bildung von Maillard-Produkten (MARTINS et al., 2001) durch die Hitzebehandlung zu vermeiden.

In den Rotkleeprodukten könnte außerdem die Aktivität des in RKB enthaltenen Enzyms PPO durch die Bildung von schlechter verdaulichen Protein-Phenol-Komplexen (KROLL et al., 2000; KROLL und RAWEL, 2001; WINTERS et al., 2008) die Protein- und AS-Verdaulichkeit reduziert haben. Der Einfluss von PPO und Phenolen in Rotklee Futtermitteln auf die XP- und AS-Verdaulichkeit beim Masthuhn muss allerdings noch weitergehend untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen den negativen Einfluss von Saponinen auf die XP- und AS-Verdaulichkeit beim Masthuhn nahe. Die höheren Verdaulichkeitswerte von LS und RKS als von LB und RKB lassen vermuten, dass der niedrigere Saponingehalt der Stängel (KALAČ et al., 1996) und somit der GP und vor allem die Veränderungen der Saponinverbindungen und -gehalte während des Silierprozesses (SZUMACHER-STRABEL et al., 2019) verantwortlich für die bessere Verdaulichkeit der Silagen waren. Auch in der Studie von PLEGER et al. (2018) wies LS eine höhere Verdaulichkeit von XP und AS auf als die aus demselben Erntematerial stammenden LB (Tabellen 5 und 7). Ebenso untermauern Ergebnisse aus einer aktuellen Verdaulichkeitsuntersuchung mit Mastschweinen (MESSINGER et al., 2020) die Vermutung, dass es durch die Silierung zu für Monogastrier positiven Veränderungen des Saponingehalts kommen könnte. In dem genannten Versuch wurde die scheinbare Rohnährstoff-Verdaulichkeit von LB, LBS, LS und RKS beim Mastschwein ermittelt. Hier wies LBS eine höhere XP-Verdaulichkeit (58 %) auf als LB (43 %). Außerdem zeigten die getrockneten LB eine niedrigere XP-Verdaulichkeit als die beiden GP-Silagen (LS 56 %, RKS 69 %). Darüber hinaus führte der Einsatz von LS in einem Fütterungsversuch mit Masthühnern zu vergleichsweise hohen Mastleistungen (WÜSTHOLZ et al., 2016). In den Silierversuchen von SZUMACHER-STRABEL et al. (2019) mit Luzerne wurden strukturelle und quantitative Veränderungen von Saponinen festgestellt. Bei zwei detektierten Glykosiden von Soyasapogenol B nahm die Konzentration des einen ab und die des anderen zu. Außerdem wurden sieben verschiedene Medicagensäure-Glykoside detektiert. Die Konzentration von fünf dieser änderte sich kaum durch die Silierung, während die beiden anderen fast komplett verschwanden. Bei den insgesamt fünf Zanhicsäure-Glykosiden nahm dagegen die Konzentration von zweien deutlich zu und die der drei anderen, darunter ein Zanhicsäure-Tridesmosid, sank sehr stark ab. Berichte aus der Literatur belegen, dass verschiedene Saponine unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen. Die Ergebnisse der Saponinanalyse von LB und LS in der

vorliegenden Verdaulichkeitsstudie sowie die Ergebnisse von PLEGER et al. (2018) und MESSINGER et al. (2020) lassen vermuten, dass die Gehalte der für den Monogastrier antinutritiv wirksamen Saponine während des Silierprozesses verringert werden. Der Einfluss der Silierung auf antinutritiv wirksame Saponine sollte in diesem Zusammenhang weiter erforscht werden. Auch SZUMACHER-STRABEL et al. (2019) folgern, dass die Isolierung von Saponinen und die Untersuchung ihrer biologischen Aktivität essenziell für die Beurteilung der Qualität von LS als Futtermittel ist. Da Saponine chemischen Umbauprozessen unterliegen, sei eine sorgfältige Analyse mit ausgereiften analytischen Verfahren notwendig, um ein genaues Bild über Gehalt und strukturelle Vielfalt der Saponine zu erhalten.

In der vorliegenden Studie wurden für die beiden GP-Silagen, LS und RKS, teilweise sehr hohe pc Verdaulichkeitswerte für XP und AS ermittelt. Insbesondere die ausgewiesenen Verdaulichkeitswerte über 85 % (beispielsweise LS: Lys 100 %, RKS: Met 99 %) sind dabei zu hinterfragen. Die Verdaulichkeit des Lys in LS ist hier jedoch nur mit einem niedrigen R^2 von 0,53 belegt. Die Verdaulichkeitswerte über 85 % in AS der RKS dagegen weisen höhere R^2 -Werte auf. Eine mögliche Begründung für die erstaunlich hohe Verdaulichkeit dieser AS der RKS könnte der frühe Schnitzeitpunkt (kurz vor der Blüte) und die damit verbundenen niedrigen XF-Anteile bei noch nicht vollzogener Lignifizierung sein. Die untersuchte RKS wies vergleichbare XF-Gehalte wie die untersuchten LB (3.1, Table 1) auf. Denkbar ist auch, dass die geringere Stabilität der Silagepellets den Tieren eine gewisse Selektion bestimmter Futterpartikel ermöglicht hat. Dadurch könnten Stängelanteile zurückgelassen und vermehrt Blattanteile (höhere AS-Konzentration, geringere XF-Anteile) aufgenommen worden sein. Dahingehende Beobachtungen wurden zwar nicht verzeichnet, eine gewisse Selektion ist jedoch nicht mit Sicherheit auszuschließen, da keine Untersuchung der Futterrückwaagen durchgeführt wurde.

4.2 Leistungsversuch: Effekte steigender Anteile an Luzerneblättern (*Medicago sativa*) auf die Mast- und Schlachtleistung ökologischer Masthühner

Eine hohe Futteraufnahme ist essenziell für eine hohe Mast- und Schlachtleistung von Masthühnern. Im vorliegenden Leistungsversuch zeigten die Tiere der LB-Gruppen (AL/ALLT-Gruppen) signifikant niedrigere Futteraufnahmen sowie Mast- und Schlachtleistungen als die Kontrollgruppe. Die niedrige Futteraufnahme ist daher als Hauptursache für die niedrige Leistung der Tiere zu sehen. Aufgrund ihres negativen Effekts auf die Futteraufnahme, vermutlich ausgelöst durch ihren bitteren Geschmack (CHEEKE, 1983; SEN et al., 1998), ist der Einfluss der in LB enthaltenen Saponine sehr wahrscheinlich. Andere antinutritiv wirksame Faktoren, wie Trypsininhibitoren, oder Maillard-Produkte, welche eventuell während der Trocknung der LB gebildet wurden, können wegen ihrer geringen Beeinflussung der Futteraufnahme ausgeschlossen werden. Auch negative Effekte durch hohe XF-Gehalte sind auszuschließen, da die XF-Gehalte der Versuchsfuttermischungen in allen Fütterungsphasen auf vergleichbarem Niveau waren (3.2, Table 6). Die Rationen der ALLT5-Gruppe zeigten etwas höhere XF-Gehalte als die der Gruppe AL4, dennoch erreichte Gruppe ALLT5 am Ende des Versuchs sogar ein numerisch höheres Gewicht und eine signifikant bessere Futterverwertung als Gruppe AL4 (3.2, Table 8 und 9).

Insgesamt stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen zum Einsatz von LB bei Hühnergeflügel überein. Wie bereits beschrieben, verzeichneten auch RITTESER und GRASHORN (2015) eine deutlich geringere Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung von Masthühnern einer langsam wachsenden Genetik bei 30 % und 50 % LB im Vergleich zu 10 % LB in Alleinfuttermischungen. Der Einsatz von 50 % LB führte dabei sogar zu Gewichtsverlusten. PEDERSEN et al. (1972) belegten in ihrer Studie mit drei verschiedenen Luzernesorten, deren Saponingehalt züchterisch verändert wurde (Linien mit niedrigem, hohem und unverändertem Saponingehalt), den Zusammenhang zwischen dem Saponingehalt von LB und der Leistung von Masthühnern (siehe auch 2.3). Im Durchschnitt war die Gewichtsentwicklung der Tiere bei hohem Saponingehalt der LB geringer als beim unveränderten und geringen Saponingehalt (10 % LB-Anteil). Dabei wurden aber teilweise bei unterschiedlichem Saponingehalt von LB verschiedener Luzernesorten (Sorte Ladak: 1,50 %; Sorte DuPuits: 0,98 %) gleiche Gewichtszunahmen beim Masthuhn erreicht (Sorte Ladak: 382 g; Sorte DuPuits: 381 g). Hieraus wird ersichtlich, dass nicht nur die Menge, sondern vor allem die Zusammensetzung

der Saponine relevant für die Beurteilung von LB als Futtermittel ist. Aufgrund der unterschiedlichen antinutritiven Wirkung verschiedener Saponine, wie beispielsweise der besonders bittere Geschmack des Zanhicsäure-Tridesmosids im Vergleich zu anderen Saponinen (OLESZEK et al., 1992), ist daher anstatt der Gesamtsaponinanalyse die strukturelle und quantitative Bestimmung einzelner Saponine für die Futtermittelbeurteilung essenziell. GERMAN und COUCH (1950) untersuchten ebenfalls den Einfluss von LB auf die Wachstumsleistung von Hühnerküken (Herkunft New Hampshire). Im Vergleich zweier unterschiedlicher LB wurden bei einem Anteil von 10 % für die eine Gruppe Wachstumsdepressionen vermerkt, wohingegen für die anderen Tiere keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt wurden. In einem weiteren Versuch wurden die Wachstumsdepressionen auslösenden LB in verschiedenen Anteilen eingesetzt. Dabei erreichte die Gruppe mit 30 % LB nur noch die Hälfte des Gewichts der Kontrollgruppe ohne LB. Aus den verschiedenen Studien wird deutlich, dass unterschiedliches LB-Material unterschiedlich starke antinutritive Wirkungen aufweisen kann und LB durchaus auch erfolgreich eingesetzt werden kann, sofern geringe Gehalte an Saponinen enthalten sind.

Aufgrund des bisher wenig untersuchten Einsatzes von LB in der Monogastrierfütterung soll im Folgenden auch auf den Einsatz von LM eingegangen werden. Verschiedene Studien zeigen, dass der Effekt von LB und LM auf die Leistung von Hühnern sowie anderen Geflügelarten und Monogastriern unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Bei Einmischung von 15 % LM in Alleinfuttermischungen für Legehennen (ISA Brown) wurde in den ersten vier Wochen des Versuchs eine signifikant niedrigere Futteraufnahme sowie über den gesamten Versuchszeitraum hinweg signifikant niedrigere Ergebnisse in den Parametern Tiergewicht, Legeleistung, Eigewicht und produzierte Eimasse im Vergleich zur LM-freien Kontrollgruppe verzeichnet (MOURÃO et al., 2006). Dagegen stellten LAUDADIO et al. (2014) beim gleichen Mischungsanteil keine Leistungsunterschiede von Legehennen (ISA Brown) bezüglich Futteraufnahme, Tiergewicht, Futterverwertung, Legeleistung und Eigewicht gegenüber der Kontrollgruppe fest. Eine verminderte Akzeptanz für luzernehaltige Futtermittel wird auch für andere Geflügelarten beschrieben. So präferierten Gänse ab einem LM-Anteil von 2,5 % und Wachteln und Puten ab einem Anteil von 5 % signifikant eine luzernefreie Kontrollfuttermischung gegenüber der luzernehaltigen Ration (CHEEKE et al., 1983). Hühnerküken bevorzugten erst ab 10 % LM und mehr die Kontrollration. Beim Vergleich zwischen LM mit niedrigem und hohem Saponingehalt wurden in diesem Versuch keine ausgeprägten

Präferenzunterschiede festgestellt. Die Sensitivität von Puten gegenüber LB wurde auch in der Untersuchung von GERMAN und COUCH (1950) belegt. Dabei reduzierte ein Anteil von 8 % LB-Mehl die Gewichtsentwicklung deutlich, nach acht Versuchswochen erreichte die 20 %-Variante nur 62 % des Gewichts der luzernefreien Kontrollgruppe. Auch bei Ratten bewirkten LB-Anteile von 44 % und 50 % stark verringerte Tageszunahmen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Sojaextraktionsschrot (CHEEKE et al., 1978). Dabei wurden allerdings keine Unterschiede im Einsatz von LB mit niedrigem (1,46 %) und nicht verändertem (2,37 %) Saponingehalt festgestellt. Antinutritive Effekte von Saponinen werden auch in der Schweinefütterung beschrieben. In ihrer Studie beobachteten CHEEKE et al. (1978) auch Leistungseinbußen bei wachsenden Schweinen, welche stark mit den Luzerne- und den Saponingehalten der verfütterten Ration korrelierten. Beim Einsatz von LM mit niedrigem (1,01 %), unverändertem (1,91 %) oder hohem (2,80 %) Saponingehalt wurden insgesamt höhere durchschnittliche Tageszunahmen bei 20 % als bei 40 % Mischungsanteil ermittelt. Die Gruppe mit 40 % LM mit hohem Saponingehalt erzielte das geringste Gewicht. Schweine mit 40 % LM mit niedrigem Saponingehalt zeigten ähnliche Wachstumsraten wie Schweine, welche 20 % LM mit unverändertem Saponingehalt über die Futtermischung erhielten. Im Gegensatz dazu zeigten Mastschweine in einem Fütterungsversuch (35 Tage) mit unterschiedlichen LB-Anteilen von 5 %, 10 % und 15 % in Alleinfuttermischungen keine signifikanten Unterschiede in Futteraufnahme und Endgewicht gegenüber der Kontrollgruppe (MESSINGER et al., 2019). Mit Tageszunahmen von 754 g/Tag bis 814 g/Tag (Tag 1-35) wurde in allen Gruppen ein hohes Leistungsniveau erreicht. Lediglich in den ersten sieben Tagen wurden Unterschiede in der Tageszunahme vermerkt, die auf die Futterumstellung auf die LB-haltigen Rationen zurückzuführen war.

Die dargestellten Berichte aus der Literatur belegen den antinutritiven Effekt der Luzernesaponine auf die Leistung monogastrischer Tiere. Insgesamt lösen geringere Luzerneanteile und Saponingehalte in Futtermischungen weniger Leistungsdepressionen aus. Die Sensitivität gegenüber Saponinen scheint allerdings zwischen den Tierarten unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Außerdem können selbst innerhalb eines Futtermittels gleiche Mischungsanteile unterschiedliche Reaktionen im Tier hervorrufen und sich dabei stark nachteilig oder unschädlich auswirken. Es ist davon auszugehen, dass dies auf unterschiedliche Saponingehalte- und Zusammensetzungen zurückzuführen ist, da die Bildung von Saponinen wie bereits dargestellt von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. Im vorliegenden Leistungsversuch mit Masthühnern

sank die Futteraufnahme ab Anteilen von 10 % LB in den Alleinfuttermischungen signifikant. Bei Anteilen von 5 % zeigten sich schon signifikante Gewichtsunterschiede, die sich mit den steigenden Anteilen auf 15 % bzw. 20 % im Verlauf des Versuchs verstärkten. Demnach zeigt auch dieser Versuch, dass sich zunehmende Anteile an LB und damit höhere Saponingehalte zunehmend negativ auf die Tiere auswirken. Es wäre grundsätzlich interessant gewesen zu beobachten, wie die Masthühner auf durchgehend geringere Mischungsanteile reagiert hätten (5-10 %). Aus praktischen Erwägungen ist es aber bedeutsam, Eiweißfuttermittel in nennenswerten Anteilen in Futtermischungen einzusetzen. Bei Betrachtung der verschiedenen Studien aus der Literatur zeigt sich, dass weniger die Höhe des Mischungsanteils relevant ist, sondern die Saponingehalte und -zusammensetzung in den Futtermitteln. Für einen erfolgreichen Einsatz von Luzerneprodukten und speziell LB ist daher die Kenntnis über die Zusammensetzung und Menge der Saponine im Futtermittel und deren genauen antinutritiven Effekte im Tier notwendig. Daraus abgeleitet könnten isolierte Saponine in verschiedenen Einsatzhöhen untersucht werden, um Einsatzbeschränkungen und mögliche Einsatzmengen von Saponinen festzulegen.

4.3 Zusammenfassende Diskussion beider Versuche

Im durchgeführten Leistungsversuch traten teilweise signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den LB-Gruppen auf, obwohl sich die Futteraufnahme nicht signifikant unterschied. Zusammen mit den Ergebnissen des durchgeführten Verdauungsversuchs lassen sich diese Gewichtsunterschiede durch die niedrige Verdaulichkeit von XP und AS der in beiden Versuchen eingesetzten, mit hoher Temperatur getrockneten LB (AL) erklären.

Weiterhin fällt auf, dass im Verdauungsversuch keine Unterschiede in der Futteraufnahme der LB-Gruppen auftraten, weder im Vergleich zur Kontrollgruppe bei 15 % LB (22.-28. Lebenstag, P2) noch innerhalb der LB-Gruppen bei Anteilen von 10 %-15 %-20 % (29.-41/42. Lebenstag, P3). Dagegen führte der Einsatz der LB im Leistungsversuch zu signifikant verringerten Futteraufnahmen ab einem Anteil von 10 % LB. Dies lässt sich möglicherweise durch die schon frühe Einmischung von LB (ab dem 1. (P1) bzw. 15. Lebenstag (P2)) erklären. CHELED-SHOVAL et al. (2014) zeigten, dass durch eine postnatale Applikation (3. Lebenstag) einer Lösung mit bitter schmeckendem Chinin bei Hühnern die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im Gaumen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant steigt und nach dem Schlupf die Aufnahme einer bitteren Chinin-haltigen Lösung signifikant niedriger ist als die von Wasser. Darüber hinaus ist die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im Gaumen höher und die Akzeptanz von bitterschmeckenden Substanzen bei sehr jungen Hühnerküken (0.-1. Woche) niedriger als bei älteren Hühnern (4.-5., 8.-9. Woche) (DEY et al., 2018). Folglich könnten Unterschiede in der Expression von Bittergeschmacksrezeptoren und der frühen Sensibilisierung der Küken durch bitter schmeckende Saponine in den beiden durchgeführten Versuchen für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Futteraufnahme verantwortlich gewesen sein. Für die weitere Erforschung der Luzernesaponine und die Etablierung von saponinhaltigen Futtermitteln könnte die Kenntnis der altersabhängigen Reaktion auf Bitterkeit hilfreich sein. Möglicherweise könnte der Einsatz von LB zu einem späteren Zeitpunkt in der Mast zu geringeren Akzeptanzproblemen führen. Besonders die lange Mastdauer in der ökologischen Landwirtschaft würde dabei Möglichkeiten zum Einsatz von LB bieten. Diese Überlegungen bedürfen allerdings einer intensiven wissenschaftlichen Abklärung der altersabhängigen Bitterwahrnehmung und der dafür relevanten Saponine und Saponinkonzentrationen in Luzerne- und Rotkleeprodukten.

Unter den Luzernesaponinen werden aufgrund ihres bitteren Geschmacks, ihrer adstringierenden und reizenden Wirkung im Rachen und der Fähigkeit zur

Reduktion der intestinalen Potenzialdifferenz besonders Glykoside der Zanhicsäure als wichtige ANF für monogastrische Tiere vermutet (OLESZEK et al., 1992; OLESZEK et al., 1994). Die Saponinanalysen, die in den geprüften LB hohe (3.1 und 3.2, jeweils Table 5) und in der geprüften LS niedrige Gehalte eines Zanhicsäure-Glykosids zeigten (3.1, Table 5), scheinen zusammen mit den Ergebnissen der beiden durchgeführten Versuche diese Vermutung für Masthühner zu bestätigen. Jedoch sollten bei der Erforschung der Saponine auch die Saponine der Medicagensäure nicht außer Acht gelassen werden, da diese beispielsweise ebenfalls die intestinale Potenzialdifferenz reduzieren können (OLESZEK et al., 1994) und auch in den vorliegenden Studien in relativ hohen Mengen detektiert wurden.

Saponingehalte werden u. a. von der Sorte beeinflusst, verändern sich aber auch im saisonalen Verlauf eines Erntejahres. So zeigten Untersuchungen von TAVA et al. (1999) mit Luzerne, dass Konzentrationen eines Medicagensäure-Glykosids im späten Sommer sinken, während die von Zanhicsäure-Glykosiden steigen. In einem von zwei Erntejahren fanden PECETTI et al. (2006) einen ähnlichen Verlauf. Da die Zanhicsäure das 16-OH-Derivat der Medicagensäure darstellt, stellten diese Autorengruppen die Vermutung auf, dass Medicagensäure-Glykoside zu Zanhicsäure-Glykosiden oxidieren könnten und dies deren hohe Konzentrationen am Ende des Sommers erklären könnte. Luzerne, welche ab Mitte August geerntet wird, ist daher mit Vorsicht für Monogastrier einzusetzen (PECETTI et al., 2006). Möglicherweise wurde der Saponingehalt der in der vorliegenden Arbeit geprüften Futtermittel, neben den möglichen Umbauprozessen während der Silierung (SZUMACHER-STRABEL et al., 2019), auch durch deren unterschiedliche Erntezeitpunkte beeinflusst (Juli 2017: LS: 3. Schnitt, in der Knospe; RKS: 2. Schnitt, kurz vor der Blüte; September 2017: LB: 4. Schnitt, Mitte der Blüte; RKB: 4. Schnitt, Beginn der Blüte). In einem anderen Erntejahr stellten PECETTI et al. (2006) allerdings auch hohe Zanhicsäure-Konzentrationen im Mai und Juni fest. Da der Einfluss von externen (Klima) und internen (Pflanze) Faktoren auf die Bildung von Saponinen noch relativ unklar ist (PECETTI et al., 2006) und darüber hinaus auch das Vegetationsstadium (höhere Saponingehalte in früheren Stadien) eine Rolle spielt (SEN et al., 1998), kann daher über die Auswirkung des unterschiedlichen Erntezeitpunkts in den durchgeführten Untersuchungen nur spekuliert werden. Insbesondere vor diesem Hintergrund erscheint die Identifizierung saponinarmer Sorten und weitergehend auch die Züchtung solcher von großer Relevanz.

Die Saponine des Rotklees wurden bisher weniger erforscht als die der Luzerne, sodass wenig über ihren chemischen Aufbau, ihre Konzentrationen und antinutritive Wirkung bekannt ist. Je nach Standort kann sich allerdings der Anbau des Rotklees, welcher eher feuchteres Klima bevorzugt (HOF und RAUBER, 2003), gegenüber der Luzerne als vorteilhaft erweisen, da er sich an solchen Standorten besser in die Fruchtfolge einbinden lässt. Darüber hinaus belegen auch die XP- und AS-Gehalte sowie Verdaulichkeitswerte den hohen Futterwert des Rotklees. Zwar wiesen die geprüften RKB im vorliegenden Verdauungsversuch insgesamt Verdaulichkeitswerte auf nur mittlerem Niveau auf, allerdings waren diese etwas höher als die der LB. Die Verdaulichkeit von Met lag dabei sogar bei 73 %. Auch die hohen pc Verdaulichkeitswerte der untersuchten RKS und die Ergebnisse von MESSINGER et al. (2020) beim Mastschwein bescheinigen dem Rotklee ein hohes Potenzial als Eiweißfuttermittel in der Fütterung von Monogastriern. In der bereits beschriebenen Studie von AMEENUDDIN et al. (1983) (siehe 2.3) enthielt ein RKB-Proteinkonzentrat die gleiche Saponinkonzentration (0,5 %) wie die beiden LB-Proteinkonzentrate mit niedrigem Saponingehalt (0,5 %). In dem vierwöchigen Fütterungsversuch mit 40 % Mischungsanteil der jeweiligen Proteinkonzentrate erreichten die Masthühnerküken der Rotkleegruppe (574 g) vergleichbare Gewichtszunahmen zu denen der Luzernegruppen (654 g bzw. 581 g). Informationen zur Zusammensetzung der Saponine gibt es aus dieser Studie nicht. Der Einsatz von Rotkleeprodukten in der Masthühnerfütterung erscheint insgesamt vielversprechend und sollte weiter untersucht werden. Ein Fütterungsversuch ähnlich des Leistungsversuchs mit LB könnte weitere Informationen zu Möglichkeiten der Fütterung von Masthühnern mit Rotkleeprodukten liefern. Grundsätzlich bedarf es insbesondere der Erforschung der in Rotklee enthaltenen Saponine und deren Wirkung auf das Tier. Außerdem sollten auch eventuelle negative Einflüsse der PPO-Aktivität durch die Bildung von Protein-Phenol-Komplexen genauer geprüft werden.

4.4 Schlussfolgerungen

Grünleguminosen-Produkte können eine große Varianz innerhalb der Inhaltsstoffe und ANF aufweisen. Die Ergebnisse des durchgeführten Verdauungsversuchs belegen, dass GP-Silagen aus Luzerne und Rotklee nicht nur die Richtlinien-Vorgabe der Raufutternorm erfüllen und damit zur Beschäftigung der Tiere beitragen, sondern durch ihre hohe Verdaulichkeit von XP und AS dabei auch einen nennenswerten nutritiven Beitrag für Masthühner leisten. Saponine scheinen im silierten Material aufgrund von Umbauprozessen während der Silierung eine geringere Rolle zu spielen als in getrocknetem Material. Die Auswirkungen der Silierung auf die Menge und Zusammensetzung der Saponine sollte allerdings weiter untersucht werden. Da mit fortschreitendem Vegetationsstadium die XP- und AS-Gehalte sinken sowie der XF-Gehalt steigt und damit die Verdaulichkeit abnimmt, ist insbesondere für GP-Produkte aus Luzerne und Rotklee ein früher Schnitzeitpunkt (vor der Knospe/Knospe) anzustreben. Die eigenen Verdaulichkeitsergebnisse sowie die Ergebnisse von WÜSTHOLZ et al. (2016) zeigen, dass der Einsatz von LS als Eiweiß- und Raufuttermittel für Masthühner vielversprechend ist. Ob die hohe pcV von XP und AS der RKS bei Masthühnern zu hohen Mast- und Schlachtleistungen führt, sollte in einem Leistungsversuch geprüft werden.

Aufgrund der starken Leistungsdepressionen, welche bei Einmischung steigender Anteile an LB im Leistungsversuch festgestellt wurden, ist der Einsatz von getrockneten LB in der Fütterung von ökologischen Masthühnern zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu empfehlen. Da die getrockneten RKB nicht im Leistungsversuch geprüft wurden, kann über ihre Auswirkungen auf die Mast- und Schlachtleistung keine Aussage getroffen werden. In welchem Umfang der Einsatz von RKB möglich ist, bleibt abzuklären. Da durch die Blatt-Stängeltrennung höhere XP- und AS- sowie niedrigere XF-Gehalte im Vergleich zur GP erzielt werden, wird weiterhin Potenzial im Einsatz der Blattmasse von Grünleguminosen gesehen. Allerdings ist die weitere Erforschung der enthaltenen ANF, insbesondere der Saponine, von großer Bedeutung für den erfolgreichen Einsatz dieser Futtermittel. Dabei muss die Gesamtheit der in den einzelnen Grünleguminosen vorkommenden Saponine bestimmt werden. Die Isolierung von individuellen Saponinen ermöglicht die Untersuchung ihrer antinutritiven Wirkung in Bezug auf Bitterkeit und gastrointestinale Verdauungs- und Absorptionsprozesse. Durch die Identifizierung der relevanten, antinutritiven Saponine könnten in der Folge Einsatzhöchstmengen definiert werden. Außerdem sollte auch der Einfluss verschiedener Faktoren wie Vegetationsstadium, Jahreszeit, Klima und Silierung

weiter untersucht werden. Durch die Bestimmung der Saponingehalte verschiedener Sorten könnten möglicherweise saponinarme Sorten gefunden werden, deren Einsatz erfolgreich in der Masthühnerfütterung möglich sein könnte. Auch die Züchtung von saponinarmen Sorten stellt eine denkbare Lösung dar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Laut den EU-Öko-Richtlinien sollen in der ökologischen Masthühnerfütterung ökologisch sowie überwiegend im eigenen Betrieb bzw. regional erzeugte Futtermittel eingesetzt werden. Allerdings stehen in der EU sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht ausreichend Eiweißfuttermittel für die bedarfsgerechte Versorgung von Geflügel mit essenziellen Aminosäuren (AS), insbesondere mit der erstlimitierenden AS Methionin, in der ökologischen Landwirtschaft zur Verfügung. Deshalb wurde die bestehende Ausnahmeregelung, 5 % konventionell erzeugte Eiweißfuttermittel für Geflügel einzusetzen, bis 31. Dezember 2020 verlängert. Um eine 100 %-Biofütterung zu realisieren, werden neue Lösungsansätze benötigt. Der Einsatz von Grünleguminosen wie Luzerne oder Rotklee könnte eine Lösung darstellen. Vor der Blüte geerntet, werden in der Luzerne bzw. im Rotklee Rohproteingehalte (XP) von durchschnittlich 244 g/kg Trockenmasse (TM) bzw. 225 g/kg TM sowie Methionin-Gehalte von 2,2 bzw. 1,9 g/kg TM mit Rohfasergehalten (XF) von jeweils 172 g/kg TM erreicht. Bei einem sehr frühen Schnitzeitpunkt vor der Knospe kann die Luzerne-Ganzpflanze Gehalte von bis zu 299 g XP/kg TM und 5,3 g Methionin/kg TM sowie 217 g XF/kg TM aufweisen. Die Trennung der Blatt- von der Stängelmasse stellt eine Möglichkeit dar, den XF-Gehalt der Blattmasse im Vergleich zur Ganzpflanze (GP) von Luzerne bzw. Rotklee zu reduzieren und eine Aufkonzentrierung von XP und AS zu erreichen. Jedoch enthalten Luzerne und Kleearten auch Saponine als sekundäre Inhaltsstoffe, die insbesondere für monogastrische Tiere antinutritiv wirksam sind. Negative Effekte sind u. a. der bittere Geschmack, die Reduzierung der Futteraufnahme, die Beeinflussung von Verdauungs- und Absorptionsprozessen sowie Wachstumsdepressionen. Allerdings kommt es während der Silierung von Luzerne zu quantitativen und strukturellen Veränderungen im Saponingehalt.

Die vorliegende Arbeit umfasst zwei Fütterungsversuche mit Masthühnern (genetische Herkunft: Hubbard JA-757). In einem Verdauungsversuch wurde die praecaecale Verdaulichkeit (pcV) von XP und AS von Luzerneblättern (LB), Luzernesilage (LS), Rotkleeblättern (RKB) und Rotkleesilage (RKS) mittels linearer Regression ermittelt. Durch die Saponinanalyse von LS und LB sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Saponingehalt und pcV von XP und AS ermittelt werden. Die Prüffuttermittel wurden in den Zulagestufen 10 %, 15 % bzw. 20 % im Austausch mit Maisstärke in Alleinfuttermischungen eingemischt. Titandioxid diente als unverdaulicher Marker für die Verdaulichkeitsbestimmung.

An Tag 41/42 erfolgte die Tötung der Tiere und die Gewinnung des Chymus (boxenweise) aus den letzten beiden Dritteln des Darmabschnitts zwischen Meckel'schem Divertikulum und 2 cm vor dem Übergang des Ileums in Colon bzw. Caeca. Für die Analyse von XP, AS und Titandioxid wurden die Chymusproben eingefroren und gefriergetrocknet. Die Beziehung zwischen der Menge der täglich aufgenommenen XP bzw. AS (Tag 30-41/42) und der Menge der bis zum Ende des Ileums verdauten XP bzw. AS wurde durch eine lineare Regression beschrieben, deren Steigung die pcV von XP und AS der jeweiligen Prüffuttermittel LB, LS, RKB und RKS angibt. Die Blätter von Luzerne und Rotklee wiesen eine geringere pcV von XP und AS auf als deren GP-Silagen. So war beispielsweise Methionin weniger verdaulich in LB (61 %) und RKB (73 %) als in LS (84 %) und RKS (99 %). Die gleiche Tendenz wurde auch für Lysin (LB 49 %, RKB 61 %, LS 100 %, RKS 88 %) und andere AS gefunden. In der Saponin-Analyse wurden höhere Gehalte von Medicagensäure-Glykosiden in LS als in LB gefunden, während LB höhere Gehalte eines Zanhicsäure-Glykosids aufwies als LS. Daher wird vermutet, dass antinutritiv wirksame Saponine die Verdaulichkeit von XP und AS in LB und RKB, in ersteren insbesondere Zanhicsäure-Glykoside, negativ beeinflusst haben.

Weiterhin wurde in einem Leistungsversuch (56 Tage; 100 % Bio-Fütterung, kein Auslauf) der Effekt steigender LB-Anteile in Alleinfuttermischungen auf die Mast- und Schlachtleistung von Masthühnern untersucht. Dabei wurde auch der Effekt der Trocknungstemperatur geprüft. Eine geteilte Charge LB wurde entweder auf hoher (AL: alfalfa leaves dried by high temperatures) oder niedriger Temperatur (ALLT: alfalfa leaves dried by low temperatures) getrocknet. Das LB-Material AL entsprach dabei dem im Verdauungsversuch geprüften Material. Insgesamt 600 männliche Tiere wurden auf fünf Fütterungsgruppen aufgeteilt (Control (C), AL2, AL3, AL4, ALLT5). Der LB-Gehalt wurde in jeder der drei Fütterungsphasen um je 5 % erhöht (in %; C: 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; ALLT5: 10-15-20). Mit steigenden LB-Anteilen wurde eine signifikant niedrigere Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung registriert. Am Ende des Versuchs erreichte die Kontrollgruppe C (2204 g) das höchste, die Gruppen AL3 (1532 g), AL4 (1396 g) und ALLT5 (1472 g) die niedrigsten Mastendgewichte. In der Saponinanalyse der geprüften LB wurden hohe Gehalte an 3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagensäure und HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-Zanhicsäure ermittelt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen zu dem Schluss, dass GP-Silagen aus Luzerne und Rotklee nicht nur die Richtlinien-Vorgabe der Raufuttermittellieferung erfüllen, sondern durch ihre hohe Verdaulichkeit von XP und AS dabei auch einen

nennenswerten nutritiven Beitrag für Masthühner leisten. Aufgrund der vermutlich durch Saponine ausgelösten Leistungsdepressionen ist der Einsatz von getrockneten LB in der ökologischen Fütterung von Masthühnern zum jetzigen Zeitpunkt nicht zu empfehlen. Es sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang der Einsatz von RKB in der ökologischen Masthühnerfütterung möglich ist. Insgesamt bedarf es der intensiven wissenschaftlichen Erforschung der Saponine und deren antinutritiven Wirkung in Bezug auf Bitterkeit und gastrointestinale Verdauungs- und Absorptionsprozesse beim Mastgeflügel.

6. SUMMARY

EU guidelines require the use of organically and mainly locally produced feedstuffs in the organic feeding of broilers. The main challenge of 100 % organic feeding in broilers is the supply with amino acids, particularly with the first limiting amino acid methionine. Due to both quantitative and qualitative insufficiency of organic protein feedstuffs in the EU, a needs-based protein and amino acid (AA) supply of poultry under these conditions is still hardly feasible. Therefore, the permission of up to 5 % conventionally produced protein feedstuffs was extended until December 31st, 2020. New protein sources with a valuable AA profile are required to realize a 100 % organic feeding of broilers. Fine-seeded legumes like alfalfa and red clover could be used as protein feeds for organic broilers. Harvested before bloom, alfalfa and red clover contain on average crude protein (XP) contents of 244 g/kg dry matter (DM) and 225 g/kg DM respectively with methionine contents of 2.2 and 1.9 g/kg DM respectively as well as crude fiber (XF) levels of 172 g/kg DM. Alfalfa whole plant contains high XP contents of up to 299 g/kg DM and 5.3 g methionine/kg DM as well as 217 g XF/kg DM, when harvested at a very early stage (before bud). The separation of leaves and stems provides an opportunity to decrease the XF and increase the XP and AA contents in the leaf mass of alfalfa and red clover compared to the whole plant. Besides its valuable XP and AA content, alfalfa and red clover also contain saponins as secondary plant compounds. Saponins are considered to be antinutritional components especially for monogastric animals. Among others, important antinutritional effects of saponins are a bitter taste, reduced feed intake, an impaired nutrient digestion and absorption and growth depression. Ensiling of alfalfa leads to structural and quantitative changes of saponins.

The present thesis involves two feeding trials with broilers (genotype: Hubbard JA-757). In a digestibility trial the precaecal (pc) digestibility of XP and AA from alfalfa leaves (AL), red clover leaves (RCL), alfalfa silage (AS) and red clover silage (RCS) was determined by linear regression. A possible relation between saponin content and pc digestibility of XP and AA was evaluated by the saponin analysis of AL and AS. The test feedstuffs were included in the diets at the levels of 10 %, 15 % and 20 % respectively at the expense of maize starch. Titanium dioxide was used as an indigestible marker for digestibility estimation. On day 41/42, digesta was sampled pen-wise from the terminal two thirds of the intestine section between Meckel's diverticulum up to 2 cm anterior to the ileocaeca-colonic junction. Digesta was frozen and freeze-dried for the analysis of XP, AA and titanium dioxide. A linear regression was applied between the daily intake of XP and AA (day 30-

41/42) and the amount of XP and AA digested up to the terminal ileum to calculate the digestibility coefficients of XP and AA of the test feedstuffs. The slope of the regression was taken as a measure of the pc digestibility of XP and AA for the respective test feedstuff (AL, AS, RCL, RCS). The pc XP and AA digestibility of AL and RCL was lower than of AS and RCS. Methionine was less digestible in AL (61 %) and RCL (73 %) than in AS (84 %) and RCS (99 %). This tendency was also observed for lysine (AL 49 %, RCL 61 %, AS 100 %, RCS 88 %) as well as for other AA. The saponin analysis showed higher contents of medicagenic acid glycosides in AS than in AL, whereas higher contents of zanhic acid glycosides were found in AL than in AS. It is hypothesized that saponins adversely affect the pc digestibility of XP and AA in AL and RCL, in the former one particularly zanhic acid glycosides.

Furthermore, a performance trial (56 days; 100 % organic feeding, no outdoor access) was conducted to evaluate the effects of increasing alfalfa leaf levels on the fattening and slaughtering performance of organic broilers. The impact of drying temperature was studied using two batches of alfalfa leaves, which were either dried at low (alfalfa leaves low temperature (ALLT)) or high temperatures (alfalfa leaves (AL)). The latter was the same material as it was used in the digestibility trial. Six hundred male Hubbard JA-757 broilers were divided into five feeding groups (Control (C), AL2, AL3, AL4, ALLT5). Alfalfa leaf content was increased in each of the three fattening phases by 5 % (in %; C: 0-0-0; AL2: 0-5-10; AL3: 5-10-15; AL4: 10-15-20; ALLT5: 10-15-20). With increasing alfalfa leaf levels, broilers showed a significantly reduced feed intake and lower body weights. At the end of the experiment, broilers in group C had the highest body weights (2204 g). Groups AL3 (1532 g), AL4 (1396 g), and ALLT5 (1472 g) showed the lowest body weights. The saponin analysis showed high contents of 3-Glc-Glc-28-Ara-Rha-Medicagenic acid and HexA-dHex-Pen-Pen-Pen-Zanhic acid in both AL and ALLT.

In sum, this work showed that whole plant silages from alfalfa and red clover not only fulfill the requirements of EU guidelines for a daily offer of roughage but also considerably contribute to the supply with AA by their high pc digestibility of XP and AA. At this time, the use of alfalfa leaves in the organic feeding of broilers is not recommended due to the depression of broiler performance, which was probably caused by antinutritional saponins. Further studies should investigate if and to which extent it is possible to use RCL in the organic feeding of broilers. Further investigations about saponins and their antinutritional effects concerning bitterness and gastrointestinal processes in fattening poultry are required.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAPA, P.K., G.J. SCHOENAU, L.G. TABIL, E.A. ARINZE, A.K. SINGH UND A.K. DALAI, 2007: Customized and value-added high quality alfalfa products: A new concept. *Agricultural Engineering International: CIGR Ejournal* (IX (June)), 1–28.
- AHMED, A., I. ZULKIFLI, A.S. FARJAM, N. ABDULLAH UND J.B. LIANG, 2014: Extrusion enhances metabolizable energy and ileal amino acids digestibility of canola meal for broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science* 13 (1), 3032, DOI:10.4081/ijas.2014.3032.
- ALBRECHT, K.A., W.F. WEDIN UND D.R. BUXTON, 1987: Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Science* 27 (4), 735–741, DOI:10.2135/cropsci1987.0011183X002700040027x.
- ÅMAN, P. UND E. NORDKVIST, 1983: Chemical composition and in-vitro degradability of major chemical constituents of red clover harvested at different stages of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34 (11), 1185–1189, DOI:10.1002/jsfa.2740341106.
- AMEENUDDIN, S., H.R. BIRD, D.J. PRINGLE UND M.L. SUNDE, 1983: Studies on the utilization of leaf protein concentrates as a protein source in poultry nutrition. *Poultry Science* 62 (3), 505–511, DOI:10.3382/ps.0620505.
- AMERAH, A.M. UND V. RAVINDRAN, 2015: Effect of coccidia challenge and natural betaine supplementation on performance, nutrient utilization, and intestinal lesion scores of broiler chickens fed suboptimal level of dietary methionine. *Poultry Science* 94 (4), 673–680, DOI:10.3382/ps/pev022.
- ARABA, M. UND N.M. DALE, 1990: Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poultry Science* 69 (1), 76–83, DOI:10.3382/ps.0690076.
- ARIJA, I., C. CENTENO, A. VIVEROS, A. BRENES, F. MARZO, J.C. ILLERA UND G. SILVAN, 2006: Nutritional evaluation of raw and extruded kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) in chicken diets. *Poultry Science* 85 (4), 635–644, DOI:10.1093/ps/85.4.635.
- ASAM, L., M. MÜLLER UND K.-P. WILBOIS, 2015: Verhalten von Sojasorten mit unterschiedlicher Trypsininhibitoraktivität bei der Aufbereitung. In: *Am Mut hängt der Erfolg. Rückblicke und Ausblicke auf die ökologische Landbewirtschaftung: Beiträge zur 13. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Eberswalde, 17.-20. März 2015*. HÄRING, A.M., B. HÖRNING, R. HOFFMANN-BAHNSEN, H. LULEY, V. LUTHARDT, J. PAPE UND G. TREI (Hrsg.), Berlin, Verlag Dr. Köster.

- BACH KNUDSEN, K.E., B.B. JENSEN UND I. HANSEN, 1993: Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of pigs fed on diets consisting of oat fractions rich in beta-D-glucan. *The British Journal of Nutrition* 70 (2), 537–556, DOI:10.1079/bjn19930147.
- BALDE, A.T., J.H. VANDERSALL, R.A. ERDMAN, J.B. REEVES UND B.P. GLENN, 1993: Effect of stage of maturity of alfalfa and orchardgrass on in situ dry matter and crude protein degradability and amino acid composition. *Animal Feed Science and Technology* 44 (1-2), 29–43, DOI:10.1016/0377-8401(93)90035-I.
- BATAL, A.B. UND C.M. PARSONS, 2002: Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. *Poultry Science* 81 (3), 400–407, DOI:10.1093/ps/81.3.400.
- BAYAT, A.R., M. RINNE, K. KUOPPALA, S. AHVENJÄRVI, A. VANHATALO UND P. HUHTANEN, 2010: Ruminal large and small particle kinetics in dairy cows fed red clover and grass silages harvested at two stages of growth. *Animal Feed Science and Technology* 155 (2-4), 86–98, DOI:10.1016/j.anifeedsci.2009.10.005.
- BELLOF, G., 2013: Heimische Sojaprodukte in der Fütterung landwirtschaftlicher Nutztiere. Zugriff: 23. Januar 2020, URL: http://orgprints.org/24970/1/soja_fuetterungsfibel.pdf.
- BELLOF, G., E. SCHMIDT UND M. RISTIC, 2005: Einfluss abgestufter Aminosäuren-Energie-Verhältnisse im Futter auf die Mastleistung und den Schlachtkörperwert einer langsam wachsenden Herkunft in der ökologischen Broilermast. *European Poultry Science* 69, 252–260.
- BELLOF, G. UND R. TIMMLER, 2004: Rationsgestaltung Mastgeflügel. In: *Ökologische Geflügelerzeugung: Fütterung und Management*. DEERBERG, F., R. JOOST-MEYER ZU BAKUM UND M. STAACK (Hrsg.), Mainz, Bioland-Verl., S. 54–75.
- BEYER, M., A. CHUDY, B. HOFFMANN, L. HOFFMANN, W. JENTSCH, W. LAUBE, K. NEHRING UND R. SCHIEMANN, 1977: Das DDR-Futterbewertungssystem: Kennzahlen des Futterwertes und Futterbedarfs für Fütterung und Futterplanung. Berlin, Deutscher Landwirtschaftsverlag.
- BIALY, Z., M. JURZYSTA, W. OLESZEK, S. PIACENTE UND C. PIZZA, 1999: Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *Journal of agricultural and food chemistry* 47 (8), 3185–3192, DOI:10.1021/jf9901237.
- BIOLAND - VERBAND FÜR ORGANISCH-BIOLOGISCHEN LANDBAU, 2019: Bioland-Richtlinien, Fassung vom 25. November 2019. Zugriff: 21. März 2020, URL: https://www.bioland.de/fileadmin/dateien/HP_Dokumente/Richtlinien/Bioland_Richtlinien_25_Nov_2019.pdf.

- BITTNER, S., 2006: When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino acids* 30 (3), 205–224, DOI:10.1007/s00726-005-0298-2.
- BLE - BUNDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT UND ERNÄHRUNG, 2018: Bericht zur Markt- und Versorgungslage Fleisch 2018. Zugriff: 1. März 2020, URL: https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/2018BerichtFleisch.pdf;jsessionid=CEE18549E4C89F75A3A727422F7F5A17.1_cid325?__blob=publicationFile&v=5.
- BLE - BUNDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT UND ERNÄHRUNG, 2019: Bericht zur Markt- und Versorgungslage Fleisch 2019. Zugriff: 1. März 2020, URL: https://www.ble.de/SharedDocs/Downloads/DE/BZL/Daten-Berichte/Fleisch/2019BerichtFleisch.pdf;jsessionid=CEE18549E4C89F75A3A727422F7F5A17.1_cid325?__blob=publicationFile&v=2.
- BLUMENSTEIN, B., T. SIEGMEIER, F. SELSAM UND D. MÖLLER, 2018: A case of sustainable intensification: Stochastic farm budget optimization considering internal economic benefits of biogas production in organic agriculture. *Agricultural Systems* 159, 78–92, DOI:10.1016/j.agsy.2017.10.016.
- BMEL - BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT, 2020: Organic Farming in Germany. Zugriff: 2. März 2020, URL: https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/EN/Agriculture/OrganicFarming/Organic-Farming-in-Germany.pdf?__blob=publicationFile.
- BÖHM, H. UND K. AULRICH, 2019: Auswirkung der Schnittfrequenz bei Rotklee auf den Ertrag von Blattmasse, Rohproteingehalt und -ertrag. In: *Innovatives Denken für eine nachhaltige Land- und Ernährungswirtschaft: Beiträge zur 15. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Kassel, 5.-8. März 2019*. MÜHLRATH, D., J. ALBRECHT, M.R. FINCKH, U. HAMM, J. HEB, U. KNIERIM UND D. MÖLLER (Hrsg.), Berlin, Verlag Dr. Köster.
- BROWN, W.E. UND C.A. RYAN, 1984: Isolation and characterization of a wound-induced trypsin inhibitor from alfalfa leaves. *Biochemistry* 23 (15), 3418–3422, DOI:10.1021/bi00310a006.
- BROWN, W.E., K. TAKIO, K. TITANI UND C.A. RYAN, 1985: Wound-induced trypsin inhibitor in alfalfa leaves: Identity as a member of the Bowman-Birk inhibitor family. *Biochemistry* 24 (9), 2105–2108, DOI:10.1021/bi00330a002.
- BUNCHASAK, C., 2009: Role of dietary methionine in poultry production. *The Journal of Poultry Science* 46, 169–179, DOI:10.2141/jpsa.46.169.
- BUXTON, D.R., 1996: Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Animal Feed Science and Technology* 59 (1-3), 37–49, DOI:10.1016/0377-8401(95)00885-3.

- CARRASCO, L.S. UND G. BELLOF, 2013: Alfalfa (*Medicago sativa*) meal in low energy diets of organic broiler production. In: *Ideal und Wirklichkeit: Perspektiven ökologischer Landbewirtschaftung: Beiträge zur 12. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Bonn, 5-8. März 2013*. NEUHOFF, D., C. STUMM, S. ZIEGLER, G. RAHMANN, U. HAMM UND U. KÖPKE (Hrsg.), Berlin, Dr. Köster, S. 634–635.
- CARRASCO, S., G. BELLOF UND E. SCHMIDT, 2014: Nutrients deposition and energy utilization in slow-growing broilers fed with organic diets containing graded nutrient concentration. *Livestock Science* 161, 114–122, DOI:10.1016/j.livsci.2013.12.028.
- CARRASCO, S., J. WÜSTHOLZ, G. HAHN UND G. BELLOF, 2018: How does feeding organic broilers high levels of alfalfa silage affect the meat quality? *Organic Agriculture* 8 (3), 185–193, DOI:10.1007/s13165-017-0182-x.
- CASTAÑEDA, M.P., E.M. HIRSCHLER UND A.R. SAMS, 2005: Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. *Poultry Science* 84 (1), 143–147, DOI:10.1093/ps/84.1.143.
- CHANG, H.Y., G.R. REECK UND H.L. MITCHELL, 1978: Alfalfa trypsin inhibitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26 (6), 1463–1464, DOI:10.1021/jf60220a030.
- CHEEKE, P.R., 1971: Nutritional and physiological implications of saponins: a review. *Canadian Journal of Animal Science* 51 (3), 621–632, DOI:10.4141/cjas71-082.
- CHEEKE, P.R., 1983: Biological properties and nutritional significance of legume saponins. In: *Leaf Protein Concentrates*. TELEK, L., GRAHAM H. D. (Hrsg.), Westport, Connecticut, Avi Publishing Company, Inc., S. 396–414.
- CHEEKE, P.R., 1996: Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production. In: *Saponins used in food and agriculture*. WALLER, G.R. UND K. YAMASAKI (Hrsg.), New York, Plenum Press, S. 377–386.
- CHEEKE, P.R., D.C. ENGLAND UND M.W. PEDERSEN, 1978: Responses of rats and swine to alfalfa saponins. *Canadian Journal of Animal Science* 58 (4), 783–789, DOI:10.4141/cjas78-097.
- CHEEKE, P.R., J.S. POWLEY, H.S. NAKAUE UND G.H. ARSCOTT, 1983: Feed preference responses of several avian species fed alfalfa meal, high- and low-saponin alfalfa, and quinine sulfate. *Canadian Journal of Animal Science* 63 (3), 707–710, DOI:10.4141/cjas83-080.
- CHELED-SHOVAL, S.L., M. BEHRENS, W. MEYERHOF, M.Y. NIV UND Z. UNI, 2014: Perinatal administration of a bitter tastant influences gene expression in chicken palate and duodenum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62

- (52), 12512–12520, DOI:10.1021/jf502219a.
- CRÉVIEU, I., B. CARRÉ, A.-M. CHAGNEAU, J. GUÉGUEN UND J.-P. MELCION, 1997: Effect of particle size of pea (*Pisum sativum* L) flours on the digestion of their proteins in the digestive tract of broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75 (2), 217–226, DOI:10.1002/(SICI)1097-0010(199710)75:2<217::AID-JSFA867>3.0.CO;2-O.
- CURRENCE, H.D. UND W.F. BUCHELE, 1967: Leaf-strip harvester for alfalfa. *Agricultural Engineering* 48 (1), 20–23.
- DETZEL, A., M. BUSCH UND M. KRÜGER, 2018: Ökobilanz zur ökologischen Fütterung von Legehennen und Broilern unter Berücksichtigung einer ansteigenden Supplementierung mit DL-Methionin. Zugriff: 16. März 2020, URL: https://www.ifeu.de/wp-content/uploads/LCA_Oekolog_Gefluegelhaltung_ifeu_Endbericht-Extended-Summary_Deutsch.pdf.
- DEY, B., F. KAWABATA, Y. KAWABATA, S. NISHIMURA UND S. TABATA, 2018: Bitter taste sensitivity and the expression of bitter taste receptors at different growth stages of chicks. *The Journal of Poultry Science* 55 (3), 204–209, DOI:10.2141/jpsa.0170188.
- DLG, 2014: DLG-Futterwerttabellen Schweine. Frankfurt am Main, DLG-Verl.
- DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2018/1584: Durchführungsverordnung (EU) 2018/1584 der Kommission vom 22. Oktober 2018 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 889/2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen hinsichtlich der ökologischen/biologischen Produktion, Kennzeichnung und Kontrolle, ABl. L 264.
- DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) NR. 469/2013: Durchführungsverordnung (EU) Nr. 469/2013 der Kommission vom 22. Mai 2013 über die Zulassung der Futtermittelzusatzstoffe DL-Methionin, DL-Methionin-Natriumsalz, Hydroxyanalog von Methionin, Calciumsalz des Hydroxyanalog von Methionin, Isopropylester des Hydroxyanalog von Methionin, DL-Methionin, geschützt durch das Copolymer Vinylpyridin/Styrol, und DL-Methionin, geschützt durch Ethylcellulose, ABl. 136.
- EDWARDS, R.H., B.E. KNUCKLES, R.E. MILLER, D.H. CURRENCE, D. DE FREMERY UND G.O. KOHLER, 1979: Use of leaf enriching harvesting methods to increase the yield of leaf protein concentrate from lucerne. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30, 558–565.
- EISLER, M.C., M.R.F. LEE, J.F. TARLTON, G.B. MARTIN, J. BEDDINGTON, J.A.J. DUNGAIT, H. GREATHEAD, J. LIU, S. MATHEW, H. MILLER, T. MISSELBROOK, P.

- MURRAY, V.K. VINOD, R. VAN SAUN UND M. WINTER, 2014: Agriculture: Steps to sustainable livestock. *Nature* 507 (7490), 32–34, DOI:10.1038/507032a.
- EKLUND, M., M. RADEMACHER, W.C. SAUER, R. BLANK UND R. MOSENTHIN, 2014: Standardized ileal digestibility of amino acids in alfalfa meal, sugar beet pulp, and wheat bran compared to wheat and protein ingredients for growing pigs. *Journal of Animal Science* 92 (3), 1037–1043, DOI:10.2527/jas.2013-6436.
- ERTL, P., A. STEINWIDDER, M. SCHÖNAUER, K. KRIMBERGER, W. KNAUS UND W. ZOLLITSCH, 2016: Net food production of different livestock: A national analysis for Austria including relative occupation of different land categories / Netto-Lebensmittelproduktion der Nutztierhaltung: Eine nationale Analyse für Österreich inklusive relativer Flächenbeanspruchung. *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment* 67 (2), 91–103, DOI:10.1515/boku-2016-0009.
- FLACHOWSKY, G., 1973: Der Einfluß eines variierenden Energie- und Rohproteingehaltes im Mischfutter auf die Lebendmassezunahme und den Futter-, Rohprotein- und Energieverzehr sowie -aufwand von Broilern. *Archives of Animal Nutrition* 23 (3), 225–235, DOI:10.1080/17450397309424259.
- FRANCIS, G., Z. KEREM, H.P.S. MAKKAR UND K. BECKER, 2002: The biological action of saponins in animal systems: A review. *The British Journal of Nutrition* 88 (6), 587–605, DOI:10.1079/BJN2002725.
- FRÜH, B., 2014: Eiweißversorgung: Welche Möglichkeiten gibt es? *Ökologie & Landbau* 170 (2/2014), 15–17.
- FRÜH, B., B. SCHLATTER, A. ISENSEE, V. MAURER UND H. WILLER, 2015: Report on organic protein availability and demand in Europe. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, Switzerland. Zugriff: 21. März 2020, URL: <https://orgprints.org/28067/3/FINAL-REPORT-ICOPP-2015-02-08.pdf>.
- GALLER, J., 2011: Silagebereitung von A bis Z, Grundlagen – Siliersysteme – Kenngrößen. Landwirtschaftskammer Salzburg (Hrsg.). Zugriff: 21. März 2020, URL: http://www.kuhdokter.at/files/Silagebereitung_von_A-Z.pdf.
- GANZER, C., H. KLUTH UND M. RODEHUTSCORD, 2006: Untersuchung mit unterschiedlichen genetischen Herkünften von Broilern auf die praecaecale Verdaulichkeit von Aminosäuren. In: *9. Tagung Schweine- und Geflügelernährung: Tagungsband, 28.-30. November 2006, Halle (Saale)*. RODEHUTSCORD, M. (Hrsg.), Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, S. 250–252.
- GANZER, C., W. SIEGERT, H. KLUTH, J. BENNEWITZ UND M. RODEHUTSCORD, 2017: Prececal amino acid digestibility of soybean cake in fast- and slow-growing broiler chickens. *Poultry Science* 96 (8), 2804–2810, DOI:10.3382/ps/pex090.

- GAWEŁ, E. UND M. GRZELAK, 2012: The effect of a protein-xanthophyll concentrate from alfalfa (phytobiotic) on animal production - A current review. *Annals of Animal Science* 12 (3), 281–289, DOI:10.2478/v10220-012-0023-5.
- GEE, J.M. UND I.T. JOHNSON, 1988: Interactions between hemolytic saponins, bile salts and small intestinal mucosa in the rat. *The Journal of Nutrition* 118 (11), 1391–1397, DOI:10.1093/jn/118.11.1391.
- GEE, J.M., K.R. PRICE, C.L. RIDOUT, I.T. JOHNSON UND G.R. FENWICK, 1989: Effects of some purified saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Toxicology in Vitro* 3 (2), 85–90, DOI:10.1016/0887-2333(89)90049-0.
- GEE, J.M., J.M. WAL, K. MILLER, H. ATKINSON, F. GRIGORIADOU, M.V.W. WIJNANDS, A.H. PENNINKS, G. WORTLEY UND I.T. JOHNSON, 1997: Effect of saponin on the transmucosal passage of β -lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and β -lactoglobulin-sensitised rats. *Toxicology* 117 (2-3), 219–228, DOI:10.1016/S0300-483X(96)03574-3.
- GERMAN, H.L. UND J.R. COUCH, 1950: The effect of feeding varying levels of dehydrated alfalfa leaf meal on the growth of chicks and poults. *Poultry Science* 29 (6), 841–845.
- GfE - GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGIE, 1999: Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler). Frankfurt a.M., Deutschland, DLG-Verlags-GmbH.
- GOERITZ, M., R. LOGES UND F. TAUBE, 2009: Analyse des Anbaupotentials tanninreicher Futterpflanzen. In: *Futterbau und Klimawandel: Gründlandwirtschaft als Quelle und Senke vom Klimagasen; 53. Jahrestagung der AGGF vom 27. - 29. August 2009 in Kleve*. BERENDONK, C. UND G. RIEHL (Hrsg.), Kleve, Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen, S. 139–142.
- GRELA, E.R. UND K. PIETRZAK, 2014: Production technology, chemical composition and use of alfalfa protein-xanthophyll concentrate as dietary supplement. *Journal of Food Processing & Technology* 5 (10), DOI:10.4172/2157-7110.1000373.
- GRIFFITHS, D.W., 1979: The inhibition of digestive enzymes by extracts of field bean (*Vicia faba*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30 (5), 458–462, DOI:10.1002/jsfa.2740300503.
- GRUHN, K., A. HENNIG, G. SCHILLING UND M. FARACK, 1983: Bestimmung der Verdaulichkeit der Rohnährstoffe, basischen und schwefelhaltigen Aminosäuren von natürlich und technisch getrockneten Rotkleeblättern an kolostomierten Legehennen. *Archives of Animal Nutrition* 33 (2-3), 225–231,

DOI:10.1080/17450398309426919.

- GRUHN, K. UND W. WIESEMÜLLER, 1990: Untersuchungen zum Futterwert von fraktioniert geernteten Luzerneblättern an Legehybriden und Broilerzuchthennen. *Archives of Animal Nutrition* 40 (7), 607–617, DOI:10.1080/17450399009428410.
- HAKL, J., P. FUKSA, J. KONEČNÁ UND J. ŠANTRŮČEK, 2016: Differences in the crude protein fractions of lucerne leaves and stems under different stand structures. *Grass and Forage Science* 71 (3), 413–423, DOI:10.1111/gfs.12192.
- HATFIELD, R., 2015: Harvesting alfalfa leaves separately from stems. *Progressive forage*, published on 27 March 2015. Zugriff: 28. Januar 2020, URL: <https://www.progressiveforage.com/forage-production/equipment/harvesting-alfalfa-leaves-separately-from-stems>.
- HOF, C. UND R. RAUBER, 2003: Anbau von Gemengen im ökologischen Landbau. Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) (Hrsg.).
- HOFMANN, F., U. WEDDIGE, B. BLUMENSTEIN, D. MÖLLER, B. GRIEB, R. MÄDER, U. ZERGER, F. GERLACH, V. JAENSCH UND K. HARTMANN, 2015: Verbundvorhaben: Biogasanlagen im Ökolandbau: Teilvorhaben 1-3: Schlussbericht zum Vorhaben. Zugriff: 27. Januar 2020, URL: https://orgprints.org/29559/1/FNR_Abschlussbericht_BioBiogas_22003312.pdf.
- HOISCHEN-TAUBNER, S. UND A. SUNDRUM, 2016: Ermittlung des Futterwertes und der Verdaulichkeiten der Blattmassen von Luzerne und Perserklee. Schlussbericht BÖLN-Projekt, FKZ 11OE055. Zugriff: 27. Januar 2020, URL: <http://orgprints.org/30426/>.
- HUANG, K.H., V. RAVINDRAN, X. LI UND W.L. BRYDEN, 2005: Influence of age on the apparent ileal amino acid digestibility of feed ingredients for broiler chickens. *British Poultry Science* 46 (2), 236–245, DOI:10.1080/00071660500066084.
- HUANG, K.H., V. RAVINDRAN, X. LI, G. RAVINDRAN UND W.L. BRYDEN, 2007: Apparent ileal digestibility of amino acids in feed ingredients determined with broilers and layers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (1), 47–53, DOI:10.1002/jsfa.2667.
- HUHMANN, D.V. UND L.W. SUMNER, 2002: Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* 59 (3), 347–360, DOI:10.1016/S0031-9422(01)00432-0.
- IKEDO, S., M. SHIMOYAMADA UND K. WATANABE, 1996: Interaction between bovine serum albumin and saponin as studied by heat stability and protease digestion. *Journal of agricultural and food chemistry* 44 (3), 792–795.

- ISHAAYA, I. UND Y. BIRK, 1965: Soybean saponins. IV. The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes. *Journal of Food Science* 30 (1), 118–120, DOI:10.1111/j.1365-2621.1965.tb00273.x.
- JAMROZ, D., A. WILICZKIEWICZ, J. ORDA, T. WERTELECKI UND J. SKORUPIŃSKA, 2002: Aspects of development of digestive activity of intestine in young chickens, ducks and geese. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 86 (11-12), 353–366, DOI:10.1046/j.1439-0396.2002.00388.x.
- JENTSCH, W., R. SCHIEMANN UND W. WIESEMÜLLER, 1991: Zur energetischen Verwertung von Luzerneblatt durch adulte Schweine. *Archives of Animal Nutrition* 41 (3), 237–244, DOI:10.1080/17450399109428466.
- JEROCH, H., 2019a: Futtermittel und Futterzusatzstoffe: Einzelfuttermittel. In: *Geflügelernährung: Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels*. JEROCH, H., A. SIMON UND J. ZENTEK (Hrsg.), Stuttgart, Deutschland, Verlag Eugen Ulmer, S. 115–199.
- JEROCH, H., 2019b: Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels: Fütterung des Mastgeflügels. In: *Geflügelernährung: Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels*. JEROCH, H., A. SIMON UND J. ZENTEK (Hrsg.), Stuttgart, Deutschland, Verlag Eugen Ulmer, S. 381–473.
- JIANG, S., Z. GOU, L. LI, X. LIN UND Z. JIANG, 2018: Growth performance, carcass traits and meat quality of yellow-feathered broilers fed graded levels of alfalfa meal with or without wheat. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* 89 (3), 561–569, DOI:10.1111/asj.12968.
- JOHNSON, I.T., J.M. GEE, K. PRICE, C. CURL UND G.R. FENWICK, 1986: Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. *The Journal of Nutrition* 116 (11), 2270–2277, DOI:10.1093/jn/116.11.2270.
- JONES, B.A., R.D. HATFIELD UND R.E. MUCK, 1995a: Screening legume forages for soluble phenols, polyphenol oxidase and extract browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67 (1), 109–112, DOI:10.1002/jsfa.2740670117.
- JONES, B.A., R.E. MUCK UND R.D. HATFIELD, 1995b: Red clover extracts inhibit legume proteolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67 (3), 329–333, DOI:10.1002/jsfa.2740670309.
- JØRGENSEN, H., X.-Q. ZHAO, K.E. KNUDSEN UND B.O. EGGUM, 1996: The influence of dietary fibre source and level on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. *The British Journal of Nutrition* 75 (3), 379–395, DOI:10.1079/bjn19960141.

- KALAČ, P., K.R. PRICE UND G.R. FENWICK, 1996: Changes in saponin content and composition during the ensilage of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Food Chemistry* 56 (4), 377–380, DOI:10.1016/0308-8146(95)00185-9.
- KALMENDAL, R., K. ELWINGER, L. HOLM UND R. TAUSON, 2011: High-fibre sunflower cake affects small intestinal digestion and health in broiler chickens. *British Poultry Science* 52 (1), 86–96, DOI:10.1080/00071668.2010.547843.
- KAMPHUES, J., M. COENEN, C. IBEN, E. KIENZLE, J. PALLAUF, O. SIMON, M. WANNER UND J. ZENTEK (Hrsg.), 2009: *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*, Hannover, Schaper.
- KARAYILANLI, E. UND V. AYHAN, 2016: Investigation of feed value of alfalfa (*Medicago sativa* L.) harvested at different maturity stages. *Legume Research - An International Journal* (39), 237–247, DOI:10.18805/lr.v0iOF.9292.
- KHERAVII, S.K., R.A. SWICK, M. CHOCT UND S.-B. WU, 2017: Coarse particle inclusion and lignocellulose-rich fiber addition in feed benefit performance and health of broiler chickens. *Poultry Science* 96 (9), 3272–3281, DOI:10.3382/ps/pex123.
- KLUTH, H., M. FRICKE UND M. RODEHUTSCORD, 2009: Precaecal amino acid digestibility of different wheat cultivars in broilers. *European Poultry Science* 73 (2), 80–86.
- KLUTH, H., M. MANTEI, C. ELWERT UND M. RODEHUTSCORD, 2005a: Variation in precaecal amino acid and energy digestibility between pea (*Pisum sativum*) cultivars determined using a linear regression approach. *British Poultry Science* 46 (3), 325–332, DOI:10.1080/00071660500127415.
- KLUTH, H., K. MEHLHORN UND M. RODEHUTSCORD, 2005b: Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. *Archives of Animal Nutrition* 59 (4), 271–279, DOI:10.1080/17450390500217058.
- KLUTH, H. UND M. RODEHUTSCORD, 2006a: Bedeutung methodischer Aspekte in Untersuchungen zur praecaecalen Verdaulichkeit von Aminosäuren beim Geflügel. *Veterinaria ir Zootechnika* 35 (57), 72–76.
- KLUTH, H. UND M. RODEHUTSCORD, 2006b: Comparison of amino acid digestibility in broiler chickens, turkeys, and Pekin ducks. *Poultry Science* 85 (11), 1953–1960, DOI:10.1093/ps/85.11.1953.
- KOLBE, H., 2008: *Fruchtfolgegrundsätze im Ökologischen Landbau*. Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (Hrsg.). Zugriff: 27. Januar 2020, URL: https://orgprints.org/15100/1/Fruchtfolge_Internet.pdf.
- KOLBE, H., W. KARALUS, M. HÄNSEL, A. GRÜNBECK, M. GRAMM, B. ARP UND B. KRELLING, 2002: *Körnerleguminosen im Ökologischen Landbau*. Informationen

- für Praxis und Beratung. Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.).
Zugriff: 27. Januar 2020, URL: <https://orgprints.org/15102/3/Koernerleguminosen.pdf>.
- KROLL, J. UND H.M. RAWEL, 2001: Reactions of plant phenols with myoglobin: Influence of chemical structure of the phenolic compounds. *Journal of Food Science* 66 (1), 48–58, DOI:10.1111/j.1365-2621.2001.tb15580.x.
- KROLL, J., H.M. RAWEL UND N. SEIDELMANN, 2000: Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of myoglobin-phenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5), 1580–1587, DOI:10.1021/jf991172m.
- KUZMICKY, D.D. UND G.O. KOHLER, 1977: Nutritional value of alfalfa leaf protein concentrate (Pro-Xan) for broilers. *Poultry Science* 56 (5), 1510–1516, DOI:10.3382/ps.0561510.
- KWIATKOWSKA, K., M. KWIECIEŃ UND A. WINIARSKA-MIECZAN, 2017: Fast-growing chickens fed with lucerne protein-xanthophyll concentrate: growth performance, slaughter yield and bone quality. *Journal of Animal and Feed Sciences* 26 (2), 131–140, DOI:10.22358/jafs/70194/2017.
- LAUDADIO, V., E. CECI, N.M.B. LASTELLA, M. INTRONA UND V. TUFARELLI, 2014: Low-fiber alfalfa (*Medicago sativa* L.) meal in the laying hen diet: effects on productive traits and egg quality. *Poultry Science* 93 (7), 1868–1874, DOI:10.3382/ps.2013-03831.
- LEE, M.R.F., M.B. SCOTT, J.K.S. TWEED, F.R. MINCHIN UND D.R. DAVIES, 2008: Effects of polyphenol oxidase on lipolysis and proteolysis of red clover silage with and without a silage inoculant (*Lactobacillus plantarum* L54). *Animal Feed Science and Technology* 144 (1-2), 125–136, DOI:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.035.
- LEIBER, F., T. GELENCSE, A. STAMER, Z. AMSLER, J. WOHLFAHRT, B. FRÜH UND V. MAURER, 2017: Insect and legume-based protein sources to replace soybean cake in an organic broiler diet: Effects on growth performance and physical meat quality. *Renewable Agriculture and Food Systems* 32 (1), 21–27, DOI:10.1017/S1742170515000496.
- LFL - BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2016: Luzerne, Anbau - Konservierung - Verfütterung. Zugriff: 28. Januar 2020, URL: https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen/luzerne_lfl-information.pdf.
- LFL - BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2019: Gruber Tabelle zur Fütterung der Milchkühe, Zuchtrinder, Schafe, Ziegen. Zugriff: 21. März 2020, URL: <https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/publikationen/daten/informationen>

- /gruber_tabelle_fuetterung_milchkuehe_zuchtrinder_schafe_ziegen_lfl-information.pdf.
- LIVINGSTON, A.L., L.C. WHITEHAND UND G.O. KOHLER, 1977: Microbiological assay for saponin in alfalfa products. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 60 (4), 957–960.
- LÖK - LÄNDERARBEITSGEMEINSCHAFT ÖKOLOGISCHER LANDBAU, 2009: LÖK-Protokolle, Auslegungen der Rechtsvorschriften für den Ökolandbau. Zugriff: 21. März 2020, URL: https://www.oekolandbau.de/service/rechtsgrundlagen/auslegungen-der-eu-rechtsvorschriften/protokoll-details/?tx_oekolbloek_loekdetail%5Baction%5D=detail&tx_oekolbloek_loekdetail%5BagendaItemUid%5D=340&tx_oekolbloek_loekdetail%5Bcontroller%5D=Loek&tx_oekolbloek_loekdetail%5BsessionUid%5D=56&cHash=48be4c5187e463ae78488b85c0847d66.
- MALIAR, T., J. DROBNÁ, J. KRAIC, M. MALIAROVÁ UND J. JUROVATÁ, 2011: Proteinase inhibition and antioxidant activity of selected forage crops. *Biologia* 66 (1), 96–103, DOI:10.2478/s11756-010-0149-9.
- MARTINS, S.I.F.S., W.M.F. JONGEN UND M.A.J.S. VAN BOEKEL, 2001: A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* 11 (9-10), 364–373, DOI:10.1016/S0924-2244(01)00022-X.
- MASSIOT, G., C. LAVAUD, V. BESSON, L. LE MEN-OLIVIER UND G. VAN BINST, 1991: Saponins from aerial parts of alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39 (1), 78–82, DOI:10.1021/jf00001a014.
- MATEOS, G.G., E. JIMÉNEZ-MORENO, M.P. SERRANO UND R.P. LÁZARO, 2012: Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. *Journal of Applied Poultry Research* 21 (1), 156–174, DOI:10.3382/japr.2011-00477.
- MAZAHERY-LAGHAB, H., B. YAZDI-SAMADI, M. BAGHERI UND A.R. BAGHERI, 2011: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) shoot saponins: identification and bio-activity by the assessment of aphid feeding. *The British Journal of Nutrition* 105 (1), 62–70, DOI:10.1017/S0007114510003120.
- MERRY, R.J., M.R.F. LEE, D.R. DAVIES, R.J. DEWHURST, J.M. MOORBY, N.D. SCOLLAN UND M.K. THEODOROU, 2006: Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. In vitro and in vivo studies of nitrogen utilization. *Journal of Animal Science* 84 (11), 3049–3060, DOI:10.2527/jas.2005-735.
- MESSINGER, D., M. KAINDL, P. WEINDL UND G. BELLOF, 2019: Futterwert und Einsatz von Luzernetrockenblatt als Eiweißfuttermittel in der ökologischen

- Schweinemast. In: *Forum Angewandte Forschung in der Rinder- und Schweinefütterung. Tagungsunterlage: Beiträge der Veranstaltung vom 02. und 03. April 2019 in Fulda*. VERBAND DER LANDWIRTSCHAFTSKAMMERN (Hrsg.), Bonn, Verband der Landwirtschaftskammern, S. 116–119.
- MESSINGER, D., P. WEINDL, P. WEINDL, L. PLEGER UND G. BELLOF, 2020: Bestimmung der scheinbaren Verdaulichkeit der Roh Nährstoffe von Luzerne- und Rotkleeprodukten in der ökologischen Schweinefütterung. In: *Angewandte Forschung und Entwicklung für den ökologischen Landbau in Bayern, Öko-Landbautag 2020 am 27. Oktober 2020 (Online-Tagung)*. LFL (Hrsg.), S. 63–66.
- MIN, D., 2016: Effects of cutting interval between harvests on dry matter yield and nutritive value in alfalfa. *American Journal of Plant Sciences* 7, 1226–1231, DOI:10.4236/ajps.2016.78118.
- MOURÃO, J.L., P.I.P. PONTE, J.A.M. PRATES, M.S.J. CENTENO, L.M.A. FERREIRA, M.A.C. SOARES UND C.M.G.A. FONTES, 2006: Use of β -glucanases and β -1,4-xylanases to supplement diets containing alfalfa and rye for laying hens: Effects on bird performance and egg quality. *Journal of Applied Poultry Research* 15 (2), 256–265, DOI:10.1093/japr/15.2.256.
- NATURLAND - VERBAND FÜR ÖKOLOGISCHEN LANDBAU E.V., 2019: Naturland Richtlinien Erzeugung, Fassung von Mai 2019. Zugriff: 23. Januar 2020, URL: https://www.naturland.de/images/Naturland/Richtlinien/Naturland-Richtlinien_Erzeugung.pdf.
- NEWKIRK, R.W., H.L. CLASSEN UND M.J. EDNEY, 2003: Effects of prepress-solvent extraction on the nutritional value of canola meal for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 104 (1-4), 111–119, DOI:10.1016/S0377-8401(02)00331-0.
- NORIOKA, N., S. HARA, T. IKENAKA UND J. ABE, 1988: Distribution of the Kunitz and the Bowman–Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agricultural and Biological Chemistry* 52 (5), 1245–1252, DOI:10.1080/00021369.1988.10868815.
- NOZIÈRE, P., B. GRAULET, A. LUCAS, B. MARTIN, P. GROLIER UND M. DOREAU, 2006: Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131 (3-4), 418–450, DOI:10.1016/j.anifeeds.2006.06.018.
- OAKENFULL, D. UND G.S. SIDHU, 1990: Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *European Journal of Clinical Nutrition* 44 (1), 79–88.
- OLESZEK, W., 1996: Alfalfa saponins: Structure, biological activity, and chemotaxonomy. In: *Saponins used in food and agriculture*. WALLER, G.R. UND

- K. YAMASAKI (Hrsg.), New York, Plenum Press, S. 155–170.
- OLESZEK, W. UND M. JURZYSTA, 1986: Isolation, chemical characterization and biological activity of red clover (*Trifolium pratense* L.) root saponins. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 55 (2), 247–252, DOI:10.5586/asbp.1986.025.
- OLESZEK, W., M. JURZYSTA, M. PLOSZYNSKI, I.J. COLQUHOUN, K.R. PRICE UND G.R. FENWICK, 1992: Zahnic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (2), 191–196, DOI:10.1021/jf00014a005.
- OLESZEK, W., J. NOWACKA, J.M. GEE, G.M. WORTLEY UND I.T. JOHNSON, 1994: Effects of some purified alfalfa (*Medicago sativa*) saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65 (1), 35–39, DOI:10.1002/jsfa.2740650107.
- OLESZEK, W., K.R. PRICE, I.J. COLQUHOUN, M. JURZYSTA, M. PLOSZYNSKI UND G.R. FENWICK, 1990: Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root saponins: their activity in relation to a fungal bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (9), 1810–1817, DOI:10.1021/jf00099a006.
- OLESZEK, W. UND A. STOCHMAL, 2002: Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 61 (2), 165–170, DOI:10.1016/S0031-9422(02)00230-3.
- PECETTI, L., A. TAVA, M. ROMANI, M.G. de BENEDETTO UND P. CORSI, 2006: Variety and environment effects on the dynamics of saponins in lucerne (*Medicago sativa* L.). *European Journal of Agronomy* 25 (3), 187–192, DOI:10.1016/j.eja.2006.04.013.
- PEDERSEN, M.W., J.O. ANDERSON, J.C. STREET, L.C. WANG UND R. BAKER, 1972: Growth response of chicks and rats fed alfalfa with saponin content modified by selection. *Poultry Science* 51 (2), 458–463, DOI:10.3382/ps.0510458.
- PETER, W., S. DÄNICKE UND H. JEROCH, 1997: Einfluß der Ernährungsintensität auf den Wachstumsverlauf und die Mastleistung französischer „LABEL“ Broiler. *Archives of Animal Breeding* 40, 69–84.
- PIETSCH, G., J.K. FRIEDEL UND B. FREYER, 2004: Ertrag, N₂-Fixierungsleistung und Wassernutzungseffizienz von Futterleguminosen in einem Ökologischen Anbausystem. *Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften* 16, 219–220.
- PLEGER, L., P.N. WEINDL, P.A. WEINDL, L.S. CARRASCO, E. KIENZLE UND G. BELLOF, 2018: Precaecal digestibility of alfalfa products as an organic feedstuff in broilers. In: *22nd Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition: September 6th-8th, 2018, Munich, Germany*:

- proceedings*, Berlin, ESVCN, S. 40.
- PLITZNER, C. UND R. LEITGEB, 2004: Imageverbesserung der Broilerfütterung durch Nutzung von Grünfütterflächen. In: *Fütterungsstrategien und Produktqualität: Tagungsband; 3. BOKU-Symposium Tierernährung; 4. November 2004 in Wien*. WINDISCH, W.M. (Hrsg.), Wien, BOKU, S. 129–134.
- PONTE, P.I.P., L.M.A. FERREIRA, M.A.C. SOARES, M.A.N.M. AGUIAR, J.P.C. LEMOS, I. MENDES UND C.M.G.A. FONTES, 2004a: Use of cellulases and xylanases to supplement diets containing alfalfa for broiler chicks: Effects on bird performance and skin color. *Journal of Applied Poultry Research* 13 (3), 412–420, DOI:10.1093/japr/13.3.412.
- PONTE, P.I.P., I. MENDES, M. QUARESMA, M.N.M. AGUIAR, J.P.C. LEMOS, L.M.A. FERREIRA, M.A.C. SOARES, C.M. ALFAIA, J.A.M. PRATES UND C.M.G.A. FONTES, 2004b: Cholesterol levels and sensory characteristics of meat from broilers consuming moderate to high levels of alfalfa. *Poultry Science* 83 (5), 810–814, DOI:10.1093/ps/83.5.810.
- POTTER, S.M., R. JIMENEZ-FLORES, J. POLLACK, T.A. LONE UND M.D. BERBER-JIMENEZ, 1993: Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (8), 1287–1291, DOI:10.1021/jf00032a023.
- PRESTO ÅKERFELDT, M., J. NIHLSTRAND, M. NEIL, N. LUNDEHEIM, H.K. ANDERSSON UND A. WALLENBECK, 2019: Chicory and red clover silage in diets to finishing pigs—influence on performance, time budgets and social interactions. *Organic Agriculture* 9 (1), 127–138, DOI:10.1007/s13165-018-0216-z.
- RAHARJO, Y. UND D.J. FARRELL, 1984: A new biological method for determining amino acid digestibility in poultry feedstuffs using a simple cannula, and the influence of dietary fibre on endogenous amino acid output. *Animal Feed Science and Technology* 12 (1), 29–45, DOI:10.1016/0377-8401(84)90034-8.
- RAVINDRAN, V., L.I. HEW, G. RAVINDRAN UND W.L. BRYDEN, 1999: A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in food ingredients for poultry. *British Poultry Science* 40 (2), 266–274, DOI:10.1080/00071669987692.
- RAVINDRAN, V., Y.B. WU UND W.H. HENDRIKS, 2004: Effects of sex and dietary phosphorus level on the apparent metabolizable energy and nutrient digestibility in broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition* 58 (5), 405–411, DOI:10.1080/00039420400008582.
- RICHTLINIE 2007/43/EG: Richtlinie 2007/43/EG des Rates vom 28. Juni 2007 mit Mindestvorschriften zum Schutz von Masthühnern, ABl. 182.
- RITTESER, C. UND M. GRASHORN, 2015: Bestimmung präcecaler

- Verdaulichkeitskoeffizienten für heimische Energiefuttermittel für die Hühnermast. Schlussbericht BÖLN-Projekt FKZ 2811OE070.
- ROCHELL, S.J., C.M. PARSONS UND R.N. DILGER, 2016: Effects of *Eimeria acervulina* infection severity on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and plasma concentrations of amino acids, carotenoids, and α 1-acid glycoprotein in broilers. *Poultry Science* 95 (7), 1573–1581, DOI:10.3382/ps/pew035.
- RODEHUTSCORD, M., 2007: Untersuchungen zur Aminosäurenverdaulichkeit bei Geflügel unterschiedlicher Herkunft und Nutzungsrichtung. Schlussbericht BOEL-Projekt, FKZ 03OE386. Zugriff: 21. März 2020, URL: <https://orgprints.org/11440/1/11440-03OE386-uni-halle-rodehutscord-2007-gefluegel.pdf>.
- RODEHUTSCORD, M., M. KAPOCIUS, R. TIMMLER UND A. DIECKMANN, 2004: Linear regression approach to study amino acid digestibility in broiler chickens. *British Poultry Science* 45 (1), 85–92, DOI:10.1080/00071660410001668905.
- RODEHUTSCORD, M. UND H. KLUTH, 2003: Aminosäurenverdaulichkeit als ein Futterwertkriterium in der Geflügelfütterung: Methodische Aspekte zur Messung. *Lohmann Information* 4/2003, 1–8.
- ROTH, F.X., M. KIRCHGESSNER UND W. WINDISCH, 1993: Mastleistung männlicher Broiler bei unterschiedlichem Energiegehalt und Energie/Protein-Verhältnis des Futters in der verlängerten Mast: Performance of male broilers fed with different energy content and protein energy ratio in the diet during the prolonged finisher phase. *European Poultry Science* 57, 91–95.
- SAUER, N., K. EMRICH, H.-P. PIEPHO, A. LEMME, M.S. REDSHAW UND R. MOSENTHIN, 2008: Meta-analysis of the relative efficiency of methionine-hydroxy-analogue-free-acid compared with DL-methionine in broilers using nonlinear mixed models. *Poultry Science* 87 (10), 2023–2031, DOI:10.3382/ps.2007-00514.
- SCHAAACK, D., H. QUAING, T. NUSCH, C. RAMPOLD UND M. M. BECK, 2018: Analyse des Bio-Geflügelmarktes. Schlussbericht BÖLN-Projekt, FKZ 15OE071. Zugriff: 1. März 2020, URL: <https://orgprints.org/33738/>.
- SCHAAACK, D. UND C. RAMPOLD, 2018: Umsatzentwicklung bei Bio-Lebensmitteln 2017 - Deutscher Bio-Markt knackt die 10 Mrd. €-Marke. In: *Zahlen - Daten - Fakten: Die Bio-Branche 2018*. BÖLW (Hrsg.), S. 14–15.
- SCHADER, C., A. MULLER, N.E.-H. SCIALABBA, J. HECHT, A. ISENSEE, K.-H. ERB, P. SMITH, H.P.S. MAKAR, P. KLOCKE, F. LEIBER, P. SCHWEGLER, M. STOLZE UND U. NIGGLI, 2015: Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. *Journal of the Royal Society, Interface* 12 (113), 20150891, DOI:10.1098/rsif.2015.0891.

- SCHMIDT, E. UND G. BELLOF, 2008: Rationsgestaltung und Eignung unterschiedlicher Herkünfte für die ökologische Hähnchenmast. Schlussbericht BÖLN-Projekt, FKZ 06OE151. Zugriff: 27. Januar 2020, URL: <https://orgprints.org/15871/1/15871-06OE151-fh-weihenstephan-schmidt-2008-haehnchenmast.pdf>.
- SCHUMACHER, U., FIDELAK, CHRISTIAN, KOOPMANN, REGINE UND WEIßMANN, FRIEDRICH, SNIGULA, JASMIN, 2011: Wissenstandsanalyse zur Tiergesundheit aller Nutztierarten im Ökologischen Landbau und 100% Biofütterung. Abschlussbericht der BÖln-Projekte FKZ 10OE088 und FKZ 10OE089. Zugriff: 20. März 2020, URL: <https://orgprints.org/25088/1/25088-10OE088-bioland-schumacher-2011-wissenstandanalyse-tiergesundheit.pdf>.
- SEN, S., H.P.S. MAKKAR UND K. BECKER, 1998: Alfalfa saponins and their implication in animal nutrition. *Journal of agricultural and food chemistry* 46 (1), 131–140, DOI:10.1021/jf970389i.
- SHIMOYAMADA, M., S. IKEDO, R. OOTSUBO UND K. WATANABE, 1998: Effects of soybean saponins on chymotryptic hydrolyses of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (12), 4793–4797, DOI:10.1021/jf980694j.
- SHINNERS, K.J., M.E. HERZMANN, B.N. BINVERSIE UND M.F. DIGMAN, 2007: Harvest fractionation of alfalfa. *Transactions of the ASABE* 50 (3), 713–718, DOI:10.13031/2013.23125.
- SIEGERT, W., C. GANZER, H. KLUTH UND M. RODEHUTSCORD, 2018: Effect of particle size distribution of maize and soybean meal on the precaecal amino acid digestibility in broiler chickens. *British Poultry Science* 59 (1), 68–75, DOI:10.1080/00071668.2017.1380295.
- SIKORA, M.C., R.D. HATFIELD UND K.F. KALSCHUR, 2019: Fermentation and chemical composition of high-moisture lucerne leaf and stem silages harvested at different stages of development using a leaf stripper. *Grass and Forage Science* 74 (2), 254–263, DOI:10.1111/gfs.12423.
- SIMON, A. UND J. ZENTEK, 2019a: Ernährungsphysiologische Grundlagen: Bestandteile von Futtermitteln, des Geflügelorganismus und von Geflügelprodukten. In: *Geflügelernährung: Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels*. JEROCH, H., A. SIMON UND J. ZENTEK (Hrsg.), Stuttgart, Deutschland, Verlag Eugen Ulmer, S. 17–69.
- SIMON, A. UND J. ZENTEK, 2019b: Ernährungsphysiologische Grundlagen: Futterbewertung. In: *Geflügelernährung: Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels*. JEROCH, H., A. SIMON UND J. ZENTEK

- (Hrsg.), Stuttgart, Deutschland, Verlag Eugen Ulmer, S. 89–106.
- SIMON, A. UND J. ZENK, 2019c: Ernährungsphysiologische Grundlagen: Verdauung und Resorption. In: *Geflügelernährung: Ernährungsphysiologische Grundlagen, Futtermittel und Futterzusatzstoffe, Fütterung des Lege-, Reproduktions- und Mastgeflügels*. JEROCH, H., A. SIMON UND J. ZENK (Hrsg.), Stuttgart, Deutschland, Verlag Eugen Ulmer, S. 70–89.
- STANGL, G.I., 2014: Die Verdauung: Die Verdaulichkeit und ihre Beeinflussung. In: *Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*. KIRCHGEßNER, M., G.I. STANGL, F.J. SCHWARZ, F.X. ROTH, K.-H. SÜDEKUM UND K. EDER (Hrsg.), Frankfurt am Main, DLG-Verl., S. 35–45.
- STØDKILDE, L., V.K. DAMBORG, H. JØRGENSEN, H.N. LAERKE UND S.K. JENSEN, 2018: White clover fractions as protein source for monogastrics: dry matter digestibility and protein digestibility-corrected amino acid scores. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98 (7), 2557–2563, DOI:10.1002/jsfa.8744.
- SUNDE, M.L., 1992: Symposium: The scientific way to pigment poultry products. *Poultry Science* 71, 709–710.
- SZAKIEL, A., C. PAĆZKOWSKI UND M. HENRY, 2011: Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* 10 (4), 471–491, DOI:10.1007/s11101-010-9177-x.
- SZUMACHER-STRABEL, M., A. STOCHMAL, A. CIESLAK, M. KOZŁOWSKA, D. KUZNICKI, M. KOWALCZYK UND W. OLESZEK, 2019: Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99 (5), 2243–2250, DOI:10.1002/jsfa.9419.
- TAVA, A. UND P. AVATO, 2006: Chemical and biological activity of triterpene saponins from *Medicago* species. *Natural Product Communications* 1 (12), 1159–1180.
- TAVA, A., M. ODOARDI UND W. OLESZEK, 1999: Seasonal changes of saponin content in five alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars. *Agricoltura Mediterranea* 129, 111–116.
- TAVA, A., W. OLESZEK, M. JURZYSTA, N. BERARDO UND M. ODOARDI, 1993: Alfalfa saponins and sapogenins: Isolation and quantification in two different cultivars. *Phytochemical Analysis* 4 (6), 269–274, DOI:10.1002/pca.2800040605.
- TEN DOESCHATE, R.A.H.M., C.W. SCHEELE, V.V.A.M. SCHREURS UND J.D. VAN DER KLIS, 1993: Digestibility studies in broiler chickens: Influence of genotype, age, sex and method of determination. *British Poultry Science* 34 (1), 131–146, DOI:10.1080/00071669308417569.
- TIERSCHUTZ-NUTZTIERHALTUNGSVERORDNUNG: Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte

- gehaltener Tiere bei ihrer Haltung, in der Fassung der Bekanntmachung vom 22.08.2006 (BGBl. I S. 2043), zuletzt geändert durch Artikel 3 Abs. 2 des Gesetzes vom 30.06.2017 (BGBl. I S. 2147).
- TKÁČOVÁ, J., M. ANGELOVIČOVÁ, Ľ. MRÁZOVÁ, M. KLIMENT UND M. KRÁL, 2011: Effect of different proportion of lucerne meal in broiler chickens. *Animal Science and Biotechnologies* 44 (1), 141–144.
- UEDA, H., Y. KAKUTOU UND M. OHSHIMA, 1996: Growth-depressing effect of alfalfa saponin in chicks. *Animal Science and Technology (Japan)* 67 (9), 772–779, DOI:10.2508/chikusan.67.772.
- UEDA, H., S. MATSUMOTO UND K. TANOUÉ, 2004: Growth response and crop emptying in chicks force-fed diets containing various saponins. *The Journal of Poultry Science* 41 (4), 298–306, DOI:10.2141/jpsa.41.298.
- UEDA, H. UND G. SHIGEMIZU, 2001: Feeding response to tea saponin in chicks given diet selection. *The Journal of Poultry Science* 38 (4), 333–342, DOI:10.2141/jpsa.38.333.
- VAN DORLAND, H.A., M. KREUZER, H. LEUENBERGER UND H.-R. WETTSTEIN, 2008: Comparative potential of white and red clover to modify the milk fatty acid profile of cows fed ryegrass-based diets from zero-grazing and silage systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (1), 77–85, DOI:10.1002/jsfa.3024.
- VERORDNUNG (EG) NR. 834/2007: Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91, ABl. 189.
- VERORDNUNG (EG) NR. 889/2008: Verordnung (EG) Nr. 889/2008 der Kommission vom 5. September 2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen hinsichtlich der ökologischen/biologischen Produktion, Kennzeichnung und Kontrolle, ABl. 250.
- WEINDL, P., P. WEINDL, L. PLEGER, S. CARRASCO UND G. BELLOF, 2018: Einsatz von Luzerneprodukten in Alleinfuttermischungen für die Anfangsmast von Masthühnern in der ökologischen Fütterung. In: *Angewandte Forschung und Entwicklung für den ökologischen Landbau in Bayern, Öko-Landbautag 2018 am 20. September 2018 in Freising*. LFL (Hrsg.), S. 131–133.
- WELTIN, J., S. CARRASCO, U. BERGER UND G. BELLOF, 2014: Luzernesilage aus spezieller Nutzung und technologischer Aufbereitung in der ökologischen Geflügel- und Schweinefütterung. Schlussbericht BÖLN-Projekt, FKZ

- 11OE077. Zugriff: 27. Januar 2020, URL: <https://orgprints.org/26279/1/26279-11OE077-hswt-bellof-2014-luzernesilage-tierernaehrung.pdf>.
- WIENS, M.J., M.H. ENTZ, R.C. MARTIN UND A.M. HAMMERMEISTER, 2006: Agronomic benefits of alfalfa mulch applied to organically managed spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 86, 121–131, DOI:10.4141/P05-069.
- WINTERS, A.L., F.R. MINCHIN, T.P.T. MICHAELSON-YEATES, M.R.F. LEE UND P. MORRIS, 2008: Latent and active polyphenol oxidase (PPO) in red clover (*Trifolium pratense*) and use of a low PPO mutant to study the role of PPO in proteolysis reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (8), 2817–2824, DOI:10.1021/jf0726177.
- WITTEN, S., M.A. GRASHORN UND K. AULRICH, 2018: Precaecal digestibility of crude protein and amino acids of a field bean (*Vicia faba* L.) and a field pea (*Pisum sativum* L.) variety for broilers. *Animal Feed Science and Technology* 243, 35–40, DOI:10.1016/j.anifeedsci.2018.07.001.
- WPSA, 1989: European table of energy values for poultry feedstuffs. Subcommittee Energy of the Working Group No. 2 Nutrition of the European Federation of Branches of the World's Poultry Science Association. Beekbergen, Netherlands.
- WÜRZNER, H. UND F. LETTNER, 1984: Unterschiedliche Energiegehalte und Energiefuttermittel in der Geflügelmastration. 1. Mitteilung: Einfluß auf die Mast- und Schlachtleistung sowie die Schlachtkörperzusammensetzung. Sonderdruck aus *Die Bodenkultur* 35, 65–79.
- WÜSTHOLZ, J., S. CARRASCO, U. BERGER, A. SUNDRUM UND G. BELLOF, 2016: Silage from alfalfa (*Medicago sativa*) harvested at an early stage as home-grown protein feed for organic broilers. *European Poultry Science* 80, DOI:10.1399/eps.2016.150.
- YU, P., D.A. CHRISTENSEN, J.J. MCKINNON UND J.D. MARKERT, 2003: Effect of variety and maturity stage on chemical composition, carbohydrate and protein subfractions, in vitro rumen degradability and energy values of timothy and alfalfa. *Canadian Journal of Animal Science* 83 (2), 279–290, DOI:10.4141/A02-053.

8. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Gerhard Bellof für die Überlassung des Dissertationsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen und vor allem für die stetige Unterstützung und Förderung während der Promotion und der gesamten Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin danken. Ihr stets offenes Ohr für Fragen und Diskussionen und Ihre freundliche Art haben die Arbeit an der Dissertation sehr erleichtert und einen bestmöglichen Berufsstart ermöglicht.

Mein großer Dank gilt ebenso Prof. Dr. Ellen Kienzle für die Möglichkeit bei ihr als externe Doktorandin an der LMU München zu promovieren und für die professionelle, unkomplizierte und freundliche Betreuung bei der Erstellung der Dissertationsarbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Petra Weindl für die tolle Einarbeitung ins wissenschaftliche Arbeiten, für's Korrekturlesen der Publikationen und für die permanente Erreichbarkeit und die Beantwortung von Fragen, selbst während der Zeit im Mutterschutz, bedanken. Die positiven und motivierenden Gespräche haben den Arbeitsalltag sehr bereichert.

Ein riesiges Dankeschön geht auch an Peter Weindl für's Anleiten bei den täglichen Versuchsarbeiten, für die Unterstützung im Stall, für das stets offene Ohr für jegliche Fragen und Probleme, für's Korrekturlesen der Publikationen, vor allem aber für eine tolle Zusammenarbeit mit einem gut gelaunten und lustigen Kollegen.

Bei Salomé Carrasco möchte ich mich herzlich für die Unterstützung im Stall und die Hilfe bei der statistischen Auswertung der erfassten Daten bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Holger Weller für die tatkräftige Unterstützung beim Futtermischen, bei der täglichen Arbeit im Versuchsstall und bei der Hilfe in Fragen zur Geflügelhaltung.

Ebenso geht ein großer Dank an Julia Hofstetter, durch die sogar mehrtägiges Futtermischen (Kaffee und Kuchen) angenehmer wurde. Besonders möchte ich mich aber für die Hilfe im Stall und das Überwinden ihrer Abneigung gegen Hühner bedanken.

Außerdem möchte ich Eggert Schmidt für die Beantwortung der Fragen zur Genetik und die Mitnahme zu sehr interessanten Exkursionen bedanken.

Bei Alfred Seibold möchte ich mich besonders für das schnelle Lösen jedes EDV-Problems bedanken. Das hat mir die Arbeit wirklich sehr erleichtert.

Ein großer Dank gilt auch den studentischen Hilfskräften, die tatkräftig und gewissenhaft bei den täglichen Stallarbeiten geholfen haben.

Ein herzliches Dankeschön geht an Diana Messinger und Hansi Büchler für eine wunderbare gemeinsame Zeit als Kollegen an, aber auch als Freunde außerhalb der Hochschule, für die Motivation und Aufmunterung während der letzten Monate des Schreibens, für die lustigen Momente bei unseren Kaffee-Sessions, Weihnachtsmarktbesuchen oder der Alpakawanderung und im Schweinestall.

Bei Ronja Behrendt möchte ich mich für eine tolle Zeit bei der Arbeit im Lämmerstall, als Bürokollegin und so manche schöne private Unternehmung (Pferdestall, Grillen) bedanken.

Ebenso geht ein großer Dank an Peter Liebhardt für eine lustige Dienstreise nach Frankreich (Esel Jacques), unsere gemeinsamen Mittagessen in der Mensa, Weihnachtsmarktbesuche und das gegenseitige Motivieren während der Promotion.

Außerdem möchte ich mich bei Sarah Kern, Fay Sauer und Jassi Knödlseider für eine wunderbare gemeinsame Studienzeit und für die Freundschaft, die auch darüber hinaus weiter besteht, bedanken.

Ganz besonders möchte ich Maike Drescher, Ilona Wildermuth und Nina Hackenberg (Lampe) danken, für die langjährigen bzw. seit Kindertagen bestehenden, tiefen Freundschaften und die Verlässlichkeit und Unterstützung in allen Lebenslagen und damit auch während der Promotion.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Dafür dass sie mir das Studium und damit auch die Promotion ermöglicht haben, für ihre Liebe und Unterstützung sowie ihren Glauben und ihr Vertrauen in mich. Ohne euch wäre all das nicht möglich gewesen! Ebenso möchte ich meinen Brüdern Dominik, Lukas und Jonas (weil sie in Höhen und Tiefen da sind, egal ob in Spanien oder Deutschland) sowie meinen Schwägerinnen Simone, Debi und Marina und meinen Neffen und Nichten Aaron, Joel und Edda danken.

Und zum Schluss möchte ich Marie danken. Für ihr Verständnis und ihren Glauben an mich, für's Rücken stärken und für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit der Promotion, vor allem aber in den letzten Wochen und Tagen, in denen sie mit ihrer gelassenen und fröhlichen Art auch die Tiefs wieder in Hochs und in ein Lachen verwandelt hat.